

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

02.12.2004

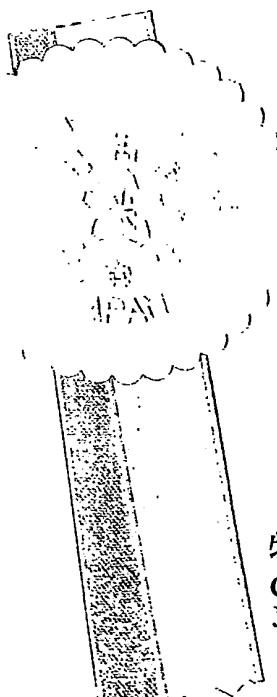
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
with this Office.

出願年月日 2004年11月30日
Date of Application:

出願番号 特願2004-345739
Application Number:
[ST. 10/C]: [JP2004-345739]

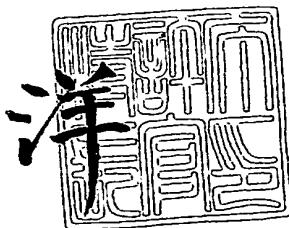
出願人 株式会社資生堂
Applicant(s):



2005年 1月21日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小川



出証番号 出証特2004-3123361

【書類名】 特許願
【整理番号】 SD040033
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 C07B 63/00
【発明者】
【住所又は居所】 神奈川県横浜市都筑区早渕2-2-1 株式会社資生堂 リサー
【氏名】 チセンター（新横浜）内
【特許出願人】
【識別番号】 000001959
【氏名又は名称】 株式会社資生堂
【代理人】
【識別番号】 100094570
【弁理士】
【氏名又は名称】 ▲高▼野 俊彦
【先の出願に基づく優先権主張】
【出願番号】 特願2003-402725
【出願日】 平成15年12月 2日
【手数料の表示】
【予納台帳番号】 019138
【納付金額】 16,000円
【提出物件の目録】
【物件名】 特許請求の範囲 1
【物件名】 明細書 1
【物件名】 図面 1
【物件名】 要約書 1

特願2004-345739

ページ： 2/E

【包括委任状番号】 0105015

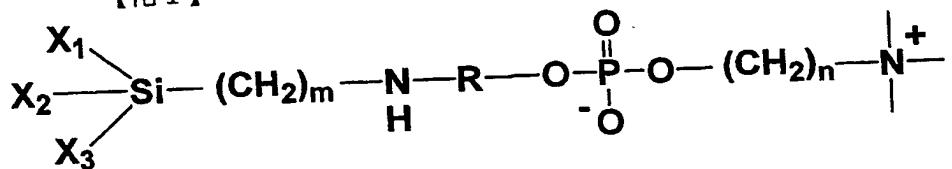
出証特2004-3123361

【書類名】特許請求の範囲

【請求項1】

下記式(1)で示されるホスホリルコリン基含有化合物。

【化1】



(1)

式中、mは2～6、nは1～4である。

X₁、X₂、X₃は、それぞれ単独に、メトキシ基、エトキシ基またはハロゲンである。ただし、X₁、X₂、X₃のうち、2つまではメチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、ブチル基、イソブチル基のいずれでも良い。

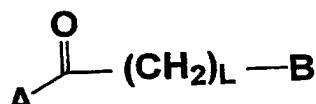
Rは下記式(2)～(4)中の構造のいずれかである（ただし、下記式(2)～(4)構造において、式(1)の化合物をA-R-Bで表す）。

【化2】



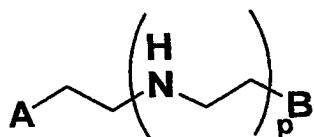
(2)

【化3】



(3)

【化4】



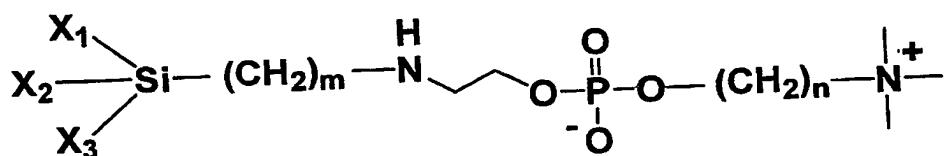
(4)

式(2)～(4)中、Lは1～6、Pは1～3を表す。

【請求項2】

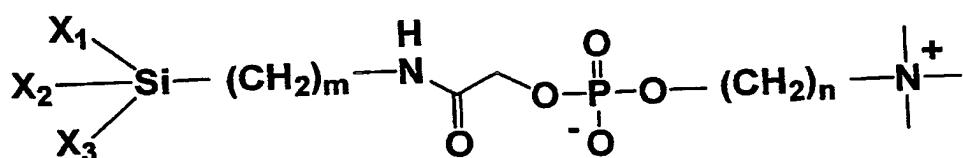
下記式(5)または(6)で示されるホスホリルコリン基含有化合物。

【化5】



(5)

【化6】



(6)

式中、mは2～6、nは1～4である。X₁、X₂、X₃は、それぞれ単独に、メトキシ基、エトキシ基またはハロゲンである。ただし、X₁、X₂、X₃のうち、2つまではメチ

ル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、ブチル基、イソブチル基のいずれでも良い。

【請求項3】

請求項1または2記載のホスホリルコリン基含有化合物からなる表面改質剤。

【請求項4】

グリセロホスホリルコリンの過ヨウ素酸ナトリウムと三塩化ルテニウムによる酸化反応によってカルボキシル基を有するホスホリルコリン誘導体を合成し、アミノ基を有する有機シラン化合物とカルボキシル基を有するホスホリルコリン誘導体から縮合剤によって合成されることを特徴とする前記式(6)記載の化合物の製造方法。

【請求項5】

請求項3記載の表面改質剤で処理された改質粉体。

【請求項6】

請求項3記載の表面改質剤で処理された改質担体からなるクロマトグラフィー用充填剤。

【請求項7】

請求項3記載の表面改質剤で処理されたフィルター。

【請求項8】

請求項3記載の表面改質剤で表面処理されたガラス製実験器具。

【書類名】明細書

【発明の名称】ホスホリルコリン基含有化合物及び該化合物からなる表面改質剤

【技術分野】

【0001】

本発明はホスホリルコリン基を含有する新規な化合物、及び該化合物からなる表面改質剤、該表面改質剤により改質された改質粉体、該改質粉体を担体として利用したクロマトグラフィー用充填剤、該表面改質剤により改質されたフィルター及びガラス製実験器具に関する。

【0002】

本発明の化合物からなる表面改質剤は、生体適合性、保湿性、その他の様々な有用な機能を物体に付与する。

【背景技術】

【0003】

ホスホリルコリン基を有する重合体は生体適合性高分子として検討されており、この重合体を各種基剤に被覆させた生体適合性材料が開発されている。

【0004】

例えば、特許文献1には、2-メタクロイルオキシエチルホスホリルコリンの単独重合体及び共重合体で被覆した粉末を、化粧料用粉末として利用して保湿性や皮膚密着性を改善した化粧料が開示されている。

【0005】

また、特許文献2及び特許文献3には、ホスホリルコリン基を有する重合体で被覆した医療用材料や分離剤が開示されている。

【0006】

上記の材料は、主に水酸基を有するアクリル系モノマーと2-クロロ-1, 3, 2-ジオキサホスホラン-2-オキシドを反応させ、更にトリメチルアミンにより4級アンモニウムとすることによりホスホリルコリン構造を有するモノマーを合成しこれを重合して得られる重合体により、その表面が被覆されたものである（重合体の製造方法に関しては特許文献4及び5を参照）。

【0007】

特許文献4には、2-メタクロイルオキシエチルホスホリルコリンとメタクリル酸エスチルの共重合体が製造され、特許文献5には2-メタクロイルオキシエチルホスホリルコリンの単独重合体が製造されている。

【0008】

一方、タンパク質やタンパク質よりも分子量が小さいポリペプチド等の生体試料をサイズ排除によって分離するGFC用充填剤には、多くの市販品が存在する。このGFC用充填剤には、架橋された親水性高分子を担体とする充填剤と、シリカゲルを担体とする充填剤が存在する。

【0009】

架橋された親水性高分子を担体とする充填剤は、適用できる移動相のpH範囲が広く、汎用性が高い。しかしながら、高分子を担体とする充填剤はシリカゲルを担体とする充填剤よりも、（1）細孔径の制御が困難であるために高理論段数を得づらい。また、（2）高速液体クロマトグラフィー（HPLC）で使用される際にかかる高圧条件に対する強度が悪いことと移動相溶媒によって粒子が膨潤することのために再現性のよいクロマトグラムを得られないことが多い。

【0010】

シリカゲルを担体とする充填剤は、タンパク質やポリペプチドのシリカゲル担体表面への吸着が問題となる。そこで、分析試料中のタンパク質やポリペプチドのシリカゲルへの吸着を抑制する目的で、非解離性の親水性基によって表面が修飾されたシリカゲルを用いた充填剤が市販されている。

【0011】

例えば、シリカゲル系GFC用カラムとして、昭和電工株式会社からは、Shodex PROTEIN KW-803（製品名）が市販されている。このシリカゲル系カラムは、カタログに、分子量数千から100万程度のタンパク質の分析に適したシリカゲル系のGFCモードのカラムであると説明されている。

また、株式会社ワイエムシイからは、YMC-Pack Dio 1（製品名）が市販されている。これもシリカゲル系のGFC用カラムであり、ジオール構造を有する官能基を用いている。これもシリカゲル担体に化学結合させたもので、分子量一万から数十万のタンパク質の分離に適用できると説明されている。

【0012】

非特許文献1には、担体上に化学的にグラフトされたホスホリルコリン基により、タンパク質の吸着が減少することが記載されている。

【0013】

また、特許文献6および7には、優れた親水性を示すことで知られているベタイン構造を有する有機シラン系表面改質剤（シランカップリング剤）が開示されている。特許文献6では、ジメチルアミノアルキルシランを有機溶媒中1,3-プロパンスルトンと反応させることで、4級アンモニウムの正電荷とスルホン酸の負電荷からなるスルホベタインを得ることができるとされている。特許文献7では、4級アミンモニウムとカルボキシル基からなるカルボキシベタインを有するシランカップリング剤を得ることができるとされている。これらのシランカップリング剤は、ガラス等に塗布し、乾燥させることで物質表面を改質することができる。しかし、これらの構造のベタインでは物質表面に優れた親水性を付与することができても、ベタイン中の正電荷と負電荷では物質表面に偏りがあるために電気的に中性にはならない。例えば、スルホベタインではスルホ酸の強酸性によって負電荷を帯び、カルボキシベタインでは4級アンモニウムによる正電荷の性質が現れる。このようなベタイン構造ではタンパク質との間で強すぎるイオン交換相互作用を生じ、タンパク質の非可逆的な吸着をもたらす。

一方、生体適合性やタンパク質吸着の抑制を目的としてこれらのシランカップリング剤が、クロマトグラフィー用充填剤やフィルター類及び実験器具類に用いられた例はない。

【特許文献1】特開平7-118123号公報

【特許文献2】特開2000-279512号公報

【特許文献3】特開2002-98676号公報

【特許文献4】特開平9-3132号公報

【特許文献5】特開平10-298240号公報

【特許文献6】特開平5-222064号公報

【特許文献7】特開昭63-295593号公報

【非特許文献1】Jian R. Lu等、Langmuir 2001, 17, 33

82-3389

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0014】

しかしながら、ホスホリルコリン基を有する重合体により、物体の表面を被覆して改質する方法では、表面全体を効果的に被覆することは難しい。また、被覆した重合体が物体から剥離するため、耐久性に問題が生じる場合がある。さらには、物体の表面が重合体により被覆されるため、ホスホリルコリン基による生体適合性等の目的とする機能を付与する目的から逸脱して、物体自体に要求されている、細孔等の微細構造のような基本的性質が失われる場合もある。

【0015】

また、ホスホリルコリン基の誘導体を低分子として物体に導入する場合でも、物体にホスホリルコリン基の誘導体と反応させることができる官能基を先に導入し、ついでホスホリルコリン基の誘導体を反応させる方法では、物体表面に未反応の官能基が物体表面に残るために生体適合性の低下に繋がる。

【0016】

例えば、まず物体表面にアミノ基を導入し、次にホスホリルコリンのアルデヒド誘導体を物体表面のアミノ基と反応させる場合、多くの未反応のアミノ基が残存してしまう。これらの残存アミノ基は別の低分子化合物を結合させることによってある程度封鎖することが可能であるが、物体表面の親水性を維持することが困難であるうえに全てを封鎖することはできない。物質表面にアミノ基が残存する場合、アミノ基は強い塩基性を有しているために、主に酸性のタンパク質が著しく強いイオン交換的な相互作用を示し、そのほとんどが吸着してしまう。クロマトグラフィー用充填剤としてとらえた場合は当該タンパク質の回収率の悪化や、ピークの著しいテーリングの原因となる。さらに、タンパク質の吸着はその変性をもたらし、生体適合性素材としてとらえた場合は炎症などの原因となるため好ましくない。

【0017】

本発明は、ホスホリルコリン基を含有する化合物と、この化合物と反応する官能基を有し、かつ、物体表面と結合を生じる官能基を持つ物体とを直接反応させると、簡便かつ高い汎用性をもって、希望する任意の量ホスホリルコリン基を、物体表面に直接付与出来ることを見出した。

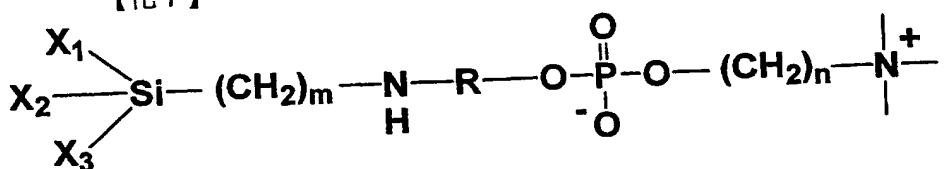
そして、該化合物からなる表面改質剤により、改質粉体、該改質粉体を担体として利用したクロマトグラフィー用充填剤、該表面改質剤により改質されたフィルター及びガラス製実験器具が容易に製造できることを見出して、本発明を完成するに至った。

【課題を解決するための手段】

【0018】

すなわち、本発明は、下記式(1)で示されるホスホリルコリン基含有化合物を提供するものである。

【化7】



(1)

式中、 m は2～6、 n は1～4である。

X_1 、 X_2 、 X_3 は、それぞれ単独に、メトキシ基、エトキシ基またはハロゲンである。ただし、 X_1 、 X_2 、 X_3 のうち、2つまではメチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、ブチル基、イソブチル基のいずれでも良い。

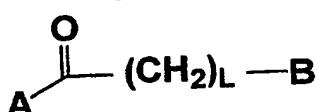
R は下記式(2)～(4)中の構造のいずれかである(ただし、下記式(2)～(4)構造において、式(1)の化合物をA-R-Bで表す)。

【化8】



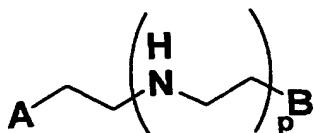
(2)

【化9】



(3)

【化10】



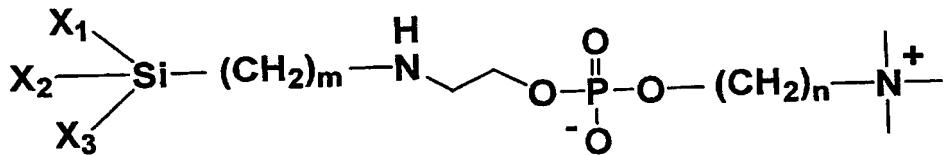
(4)

式(2)～(4)中、Lは1～6、Pは1～3を表す。

【0019】

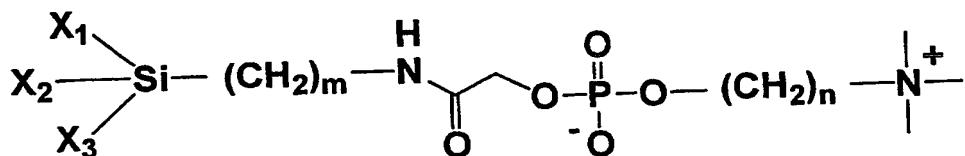
また、本発明は、下記式(5)または(6)で示されるホスホリルコリン基含有化合物を提供するものである。

【化11】



(5)

【化12】



(6)

式中、mは2～6、nは1～4である。X₁、X₂、X₃は、それぞれ単独に、メトキシ基、エトキシ基またはハロゲンである。ただし、X₁、X₂、X₃のうち、2つまではメチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、ブチル基、イソブチル基のいずれでも良い。

【0020】

また、本発明は、上記のホスホリルコリン基含有化合物からなる表面改質剤を提供するものである。

【0021】

また、本発明は、グリセロホスホリルコリンの過ヨウ素酸ナトリウムと三塩化ルテニウムによる酸化反応によってホスホリルコリン基およびカルボキシル基を有する化合物を合成分する酸化反応によってホスホリルコリン基およびカルボキシル基を有する化合物とホスホリルコリン基およびカルボキシル基を有する化合物から縮合剤によって合成されることを特徴とする前記式(6)記載の化合物の製造方法を提供するものである。

【0022】

さらに、本発明は、上記の表面改質剤で処理された改質粉体を提供するものである。

【0023】

また、本発明は、上記の表面改質剤で処理された改質担体からなるクロマトグラフィー用充填剤を提供するものである。

【0024】

さらに、本発明は、上記の表面改質剤で処理されたフィルターを提供するものである。

【0025】

また、本発明は、上記の表面改質剤で表面処理されたガラス製実験器具を提供するものである。

【発明の効果】

【0026】

本発明の化合物、該化合物からなる表面改質剤を使用すれば、各種物体の表面を、一段階の極めて簡便な反応によって、希望する任意の量のホスホリルコリン基を付与することが可能である。その結果、ホスホリルコリン基により希望する機能を有する改質粉体、該改質粉体を担体として利用したクロマトグラフィー用充填剤、該表面改質剤により改質されたフィルター及びガラス製実験器具が容易に製造できる。

【0027】

さらに詳しく言えば、本発明によれば、タンパク質やポリペプチドの吸着が極めて少ないホスホリルコリン基を、簡便かつ定量的に物体表面の微細構造を損なうことなく導入することができる。また、ホスホリルコリン基以外の未反応官能基が導入されることも無いために、極めて生体適合性の高い素材を提供することが可能である。

【0028】

シリカゲル等のクロマトグラフィー用担体に適用した場合は極めて優れたGFC用充填剤となる。本発明の表面改質剤を用いて合成されるクロマトグラフィー用充填剤の特徴は、GFCモードに起因する分子量の違いによる分離はもちろんのこと、タンパク質やポリペプチドの持つ等電点や疎水性の違いに応じた、優れた分離能を有することである。

さらに、イオン交換性や疎水性は移動相の塩濃度やpHに応じて調節することができるために、タンパク質に応じたユニークな分離をすることが可能である。そのうえ、タンパク質が粉体表面に非可逆的吸着を起こすことがないので、タンパク質の変成、失活を伴うことなく分離・分取・分析することが可能である。

【0029】

フィルター及びガラス製実験器具を本発明の表面改質剤を用いて処理した場合は、極めてタンパク質吸着の少ないフィルター及びガラス製実験器具を得ることができる。

【発明を実施するための最良の形態】

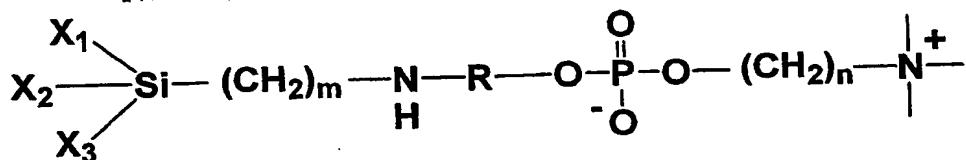
【0030】

なお、本発明の化合物は、精製、非精製を問わず表面改質が可能で、タンパク質吸着抑制などの効果を得ることができる。

【0031】

下記式(1)、または(5)若しくは(6)で示されるホスホリルコリン基含有化合物は新規化合物である。

【化13】



(1)

式中、mは2～6、nは1～4である。

X₁、X₂、X₃は、それぞれ単独に、メトキシ基、エトキシ基またはハロゲンである。ただし、X₁、X₂、X₃のうち、2つまではメチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、ブチル基、イソブチル基のいずれでも良い。

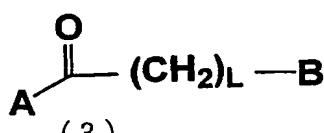
Rは下記式(2)～(4)中の構造のいずれかである(ただし、下記式(2)～(4)構造において、式(1)の化合物をA-R-Bで表す)。

【化14】



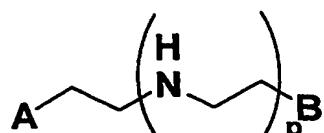
(2)

【化15】



(3)

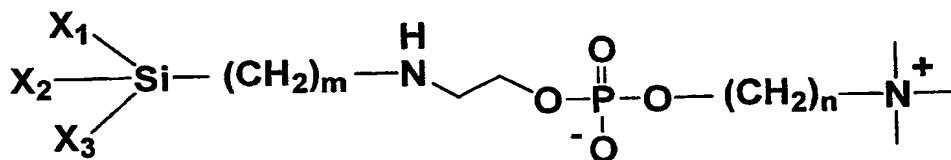
【化16】



(4)

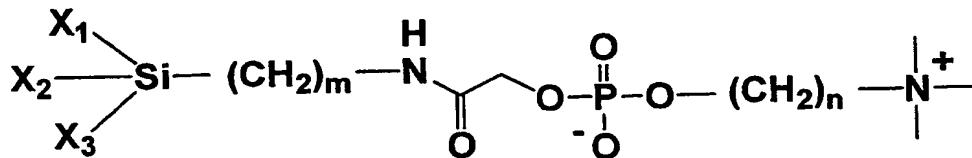
式(2)～(4)中、Lは1～6、Pは1～3を表す。

【化17】



(5)

【化18】



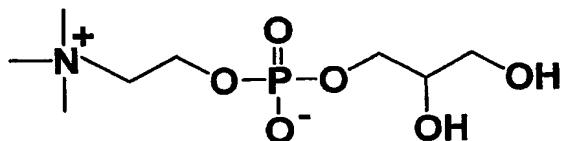
(6)

式中、mは2～6、nは1～4である。X₁、X₂、X₃は、それぞれ単独に、メトキシ基、エトキシ基またはハロゲンである。ただし、X₁、X₂、X₃のうち、2つまではメチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、ブチル基、イソブチル基のいずれでも良い。

【0032】

「式(1)、または(5)若しくは(6)のホスホリルコリン基含有化合物の製造方法」
下記式(7)に示したホスホリルコリン誘導体を蒸留水に溶解させる。下記式(7)のホスホリルコリン誘導体は公知の化合物であり市販品を入手できる。

【化19】

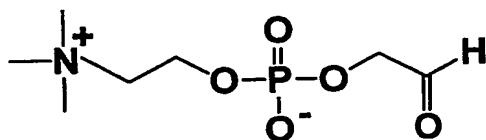


(7)

【0033】

式(7)の化合物の水溶液を氷水浴中で冷却し、過ヨウ素酸ナトリウムを添加し、5時間攪拌した。反応液を減圧濃縮、減圧乾燥し、メタノールにより下記式(8)に示すアルデヒド基を有するホスホリルコリン誘導体を抽出する。構造式及びNMRスペクトルを図1に、Massスペクトルを図18に示す。

【化20】



(8)

【0034】

次に、式(8)のメタノール溶液に3-アミノプロピルトリメトキシランを0.5当量添加する。この混合溶液を室温で所定時間攪拌したのち、氷冷し、シアノヒドロホウ素化ナトリウムを適量添加し、室温に戻して16時間攪拌する。この間も反応容器には乾燥窒素を流し続ける。沈殿をろ過した後、式(5)及び/又は式(6)のメタノール溶液を得る。

【0035】

次に、本発明の化合物の精製方法について説明する。本発明の化合物の精製方法は以下に限るものではない。

得られたメタノール溶液を減圧濃縮し、残留物を蒸留水に溶解させる。この水溶液を試料とする。疎水性相互作用とカチオン交換能を有する高速液体クロマトグラフィー用カラムである、カプセルパック SCX UG80 S-5 (サイズ: 4.6 mm i. d. × 250 mm) (株式会社資生堂) をHPLC装置に接続し、0.2 mmol/Lのリン酸緩衝液 (pH 3.5) を1 mL/分の流速で流して平衡化させたのちに、試料を10 μL注入する。検出器として示差屈折計を用いることでクロマトグラムを得られ、目的とする化合物を単離することができる。

ただし、本発明の化合物からなる表面改質剤は、精製前のメタノール溶液の段階で、そのまま用いることが可能である。

【0036】

上記の手順は、式(5)または(6)に示した化合物中のm、nが変わっても同様に行なうことができる。ここで示した手順はm=3、n=2の場合である。さらにアミノ基を有するシラン化合物として3-(2-アミノエチルアミノプロピル)トリメトキシシラン等を用いることによってシラン部位とホスホリルコリン基の間に2級アミンを挿入することも可能で、これについても上記と同様の手順で行なうことができる。反応溶媒は特に限定されず、上述したメタノール以外にも水や、エタノール、プロパノール、ブタノールなどのアルコール、N,N-ジメチルホルムアミドやジメチルスルホキシドなどの非プロトン性アルコール、N,N-ジメチルスルホキシドに変更する。

また、式(5)または(6)中のメトキシ基(OCH₃)がエトキシ基(OCH₂H₅)である場合にはメタノールをエタノールに変えて反応を行い、C1の場合はジメチルホルムアミドやジメチルスルホキシドに変更する。

さらには、Siと結合するメトキシ基またはエトキシ基またはC1の内、2つまたは1つがメチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、ブチル基、イソブチル基のいずれかで置換されている場合も上記の手法と同様に製造することができる。

【0037】

「表面改質剤」

上記式(5)および(6)の化合物は物質の表面改質剤として有用である。すなわち、物質表面に容易に希望する量のホスホリルコリン基を導入して改質するものである。具体的には、水酸基を表面に有している物質の場合、その物質表面の水酸基と式(5)および(6)の化合物のSi-OCH₃から脱水反応によって化学結合を形成させる。この化学反応はほとんどの有機溶媒中で、10℃から250℃の温度範囲で極めて容易に定量的に進行する。この脱水反応によって化学的、物理的に極めて安定なホスホリルコリン基による表面改質を施すことができる。

【0038】

なお、物質表面に水酸基が存在しない場合は、式(5)および(6)の化合物を揮発性溶媒に溶解させ、その溶液を物質表面に塗布、溶媒を乾燥させる方法が有効である。具体的としては、式(5)および(6)の化合物をメタノールに溶解させ、それを物質表面に塗布する。次に10℃から250℃の温度範囲でメタノールを気化させる。さらに必要に応じて加熱処理を行う。このとき、式(5)および(6)の化合物のSi-OCH₃どうしが脱水反応を起こし、Si-O-Si結合を生成し、物質表面を被覆することが可能である。Si-OCH₃どうしが脱水反応を起こしSi-O-Si結合を生成する反応は公知である。メタノールの揮発の際にこのように生成する膜は、ほとんどの物質表面に微量に存在する水酸基と所々で結合を生じるために安定性の良好な表面改質法となる。本法は水酸基を持たない物質のみならず、水酸基を有する物質についても極めて有効な表面改質法である。

【0039】

本発明の表面改質剤により改質される物質（若しくは素材）は、生体適合性及び親水性

に優れた材料及び成形品となる。生体適合性を有するホスホリルコリン基を素材表面に直接有する材料として、化粧料、医用材料（人工臓器、手術用器具など）、クロマト用充填剤、塗料等、幅広い用途に応用可能である。

また、本発明の表面改質剤は、分離若しくは分析装置用の配管、配管接続部品、サンプリングのためのニードル、サンプルバイアル、検出器セル等の試験液が接触する部材の改質方法として有用であり、特には、HPLC、MS、NMRの接続配管や電気泳動装置のキャピラリー配管等の素材が好ましく改質される。テフロン（登録商標）管、テフゼル管、ピーク樹脂管、フューズドシリカ管等の素材である。

[0040]

「カルボキシル基を有するホスホリルコリン誘導体を用いた式(6)記載の化合物の製造方法」
…、有機溶媒への溶解度が極端に低い。

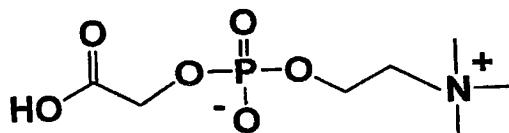
万法」
ホスホリルコリンの誘導体は極めて親水性が高く、有機溶媒への溶解度が極端に低い。
ホスホリルコリンの誘導体の合成はジオキサホスホラン類を出発物質とする全合成法と、
大豆などに含まれるリン脂質であるホスファチジルコリンの加水分解によって得られるク
リセロホスホリルコリンを出発物質とする合成法に大別される。ホスホリルコリンの誘導
体は溶解する有機溶媒が限られるために合成ルートが複雑になり、製造にかかるコストが
高く実用化の障壁となっている。この合成の複雑さとコストの問題は全合成法において最
著に現れるが、本発明の製造方法によればホスホリルコリンの誘導体にとっての良溶媒
で極めて簡便かつ高収率でカルボキシル基を有するホスホリルコリン誘導体を製造するこ
とができる、加えて安価で大量に入手することのできるホスファチジルコリン由来のグリ
コホスホリルコリンから製造することが可能であって、コストの面でも優れている。最
終的に式(6)記載の化合物についても簡便かつ高収率で得ることができる。

[0 0 4 1]

グリセロホスホリルコリン、過ヨウ素酸ナトリウム、3塩化ルテニウム(水和物)をセトニトリル水溶液に加える。室温にて攪拌した後、ろ過し、濾液から溶媒を除去する。得られた固形物からメタノールにて目的物を抽出、続いてメタノールを留去することにより得られたカルボキシル基を有するホスホリルコリン誘導体を得る。構造式及びNMRスペクトルを図16に、Massスペクトルを図17に示す。

なお、反応溶媒は水でも可能であり、また、過ヨウ素酸以外にも他の過ヨウ素酸塩や過ヨウ素酸などを用いることも可能であり、三塩化ルテニウム以外にも、他の二価及び／または三価のルテニウム化合物やそれらの水和物などを用いることも可能である。

[化21]



(9)

[0042]

次に、式(9)に示した化合物のメタノール溶液に、3-アミノプロピルトリメトキシシランを0.5等量、およびN-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)とN-エチル-N-エチルカルボジイミド(EDC)をそれぞれ1等量添加する。この混合溶液を室温にて3時間攪拌することにより、式(6)に示す化合物を得た。

溶液を室温にて3時間攪拌することにより、式(6)に示す化合物を得た。
なお、反応溶媒はN,N-ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、クロロホルムなどメタノール以外でも可能であり、また、NHS、EDC以外にも、ジシクロカルボジイミド(DCC)、カルボキシジイミダゾール(CDI)などを用いることも可能である。

上記の手順は、式(6)に示した化合物中のm、nが変わっても全く同様に行うことか
できる。ここで示した手順はm=3、n=2の場合である。ただし、反応中の有機シラン
化合物の重合を防ぐためには脱水溶媒が好ましい。

また、式(6)中のメトキシ基(OCH_3)がエトキシ基(OC_2H_5)である場合にはメタノールをエタノールに変えて反応を行い、C1の場合はジメチルホルムアミドやジメチルスルホキシドに変更する。

さらには、S iと結合するメトキシ基またはエトキシ基またはC1の内、2つまたは1つがメチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、ブチル基、イソブチル基のいずれかで置換されている場合も上記の手法と全く同様に製造することができる。

【0043】

「改質粉体」

本発明の表面改質剤は水酸基を有する粉体を改質するために好ましく使用できる。

本発明の改質粉体は以下の方法にて製造される。この方法により、ホスホリルコリン基を粉体表面に直接的に有する改質粉体、すなわち、ホスホリルコリン基が粉体表面に化学的な結合にて導入されている改質粉体が容易に製造できる。

【0044】

この改質粉体は、ホスホリルコリン基を有する重合体で被覆することによりホスホリルコリン基を導入した粉体と比較して、重合体の剥れによりホスホリルコリン基を失うことがないという利点を有する。また、重合体で被覆されていないので、粉体自体の微細構造がないという利点を有する。具体的には、本発明の表面改質剤を用いることによって粉体表面が有する立体的な数nm程度の微細構造(微細孔など)を埋めることなく表面をホスホリルコリン基で被覆することが可能である。

【0045】

また、ホスホリルコリン基の誘導体を低分子として物体に導入する場合でも、物体にホスホリルコリン基の誘導体と反応させることができると官能基を先に導入し、ついでホスホリルコリン基の誘導体を反応させる方法では、物体表面に未反応の官能基が物体表面に残るために生体適合性の低下に繋がる。例えば、まず物体表面にアミノ基を導入し、次にホスホリルコリンのアルデヒド誘導体を物体表面のアミノ基と反応させる場合、多くの未反応のアミノ基が残存してしまう。これらの残存アミノ基は別の低分子化合物を結合させるために封鎖することができるが、物体表面の親水性を維持することによってある程度封鎖することが可能であるが、物体表面の親水性を維持することによって封鎖することはできない。物質表面にアミノ基が多く残存する場合、アミノ基は強い塩基性を有しているために、主に酸性のタンパク質が著しく強い電気的相互作用を示し、そのほとんどが吸着してしまう。クロマトグラフィー用充填剤としてとらえた場合は当該タンパク質の回収率の悪化や、ピークの著しいテーリングの原因となる。さらに、タンパク質の吸着はその変性をもたらし、生体適合性素材としてとらえた場合は炎症などの原因となり、好ましくない。

【0046】

本発明による表面改質剤は合成時、アミノ基を有する有機シラン化合物に対してホスホリルコリンのアルデヒド誘導体を過剰に添加し、双方を液相中で反応させる。アミノ基とアルデヒド基の反応性は非常に高く、アルデヒドを過剰に添加した場合はほぼ100%のアルデヒド基がアルデヒドと反応することが知られている。したがって、本発明による表面改質では、アミノ基がアルデヒドと反応することが知られている。したがって、本発明による表面改質では、物体質には未反応のアミノ基は検出されない。このために本発明による表面改質では、物体質には未反応のアミノ基を混在させることなくホスホリルコリン基だけを導入することができる。このことにより、固相上で2段階の反応を行う方法よりも、極めて生体適合性に優れ、タンパク質の吸着の少ない粉体を得ることができる。

【0047】

「改質粉体の製造方法」

式(5)または(6)の化合物の0.3mmol/mLの濃度のメタノール溶液20mLに、蒸留水20mLを加え、表面改質を施す粉体を添加する。粉体の質量はその比表面積によって調整する必要がある。例えば、100m²/gの粉体の場合、その添加量は10g程度が適当である。この粉体分散液をオイルバス中80℃で還流し、5時間後に粉体をろ過し、メタノールで洗浄し、80℃で3時間減圧乾燥することで改質粉体を得る。

【0048】

用いる粉体は特に制限されない。用途に応じて一般に平均粒径0.01~10μmあるいは0.01~1000μm程度の任意の物体を意味する。具体的な粉体としては、例えば、無機粉末（例えば、タルク、カオリン、雲母、絹雲母（セリサイト）、白雲母、金雲母、合成雲母、紅雲母、黒雲母、パーミキュライト、炭酸マグネシウム、炭酸カルシウム、ケイ酸アルミニウム、ケイ酸バリウム、ケイ酸カルシウム、ケイ酸マグネシウム、ケイ酸ストロンチウム、タンクステン酸金属塩、マグネシウム、シリカ、ゼオライト、硫酸バリウム、焼成硫酸カルシウム（焼セッコウ）、リン酸カルシウム、弗素アパタイト、ヒドロキシアパタイト、セラミックパウダー、金属石鹼（例えば、ミリスチン酸亜鉛、パルミチン酸カルシウム、ステアリン酸アルミニウム）、窒化ホウ素、酸化セリウム等）；有機粉末（例えば、ポリアミド樹脂粉末（ナイロン粉末）、ポリエチレン粉末、ポリメタクリル酸メチル粉末、ベンゾグアナミン樹脂粉末、ポリ四弗化エチレン粉末、ポリメチルシルセスキオキサン粉末、シリコーンエラストマー粉末、セルロース粉末等）；無機白色顔料（例えばオキサン粉末、シリコーンエラストマー粉末、セルロース粉末等）；無機赤色系顔料（例えば、酸化鉄（ベンガラ）、チタン、二酸化チタン、酸化亜鉛等）；無機褐色系顔料（例えば、γ-酸化鉄等）；無機黄色系顔料（例えば、黄酸化鉄、黄土等）；無機黒色系顔料（例えば、黒酸化鉄、低次酸化チタン等）；無機紫色系顔料（例えば、マンガンバイオレット、コバルトバイオレット等）；無機緑色系顔料（例えば、マンガンバイオレット、コバルトバイオレット等）；無機青色系顔料（例えば、群青、酸化クロム、水酸化クロム、チタン酸コバルト等）；無機白色顔料（例えば、群青等）；パール顔料（例えば、酸化チタンコーテッドマイカ、酸化チタンコーテッドオキシ塩化ビスマス、酸化チタンコーテッドタルク、着色酸化チタンコーテッドマイカ、オキシ塩化ビスマス、魚鱗箔等）；金属粉末顔料（例えば、アルミニウムパウダー、カツオキシ塩化ビスマス、魚鱗箔等）；天然色素（例えば、クロロフィル、β-カロチン等）等が挙げられる。

[0049]

【0049】上記の製造方法により、親水性のホスホリルコリン基を任意の量で含有する粉体が簡単に得られる。また、粉体が合成ポリマーの場合、その親水部として、カルボン酸基、水酸基、1級～3級アミノ基、スルホン酸基、リン酸基、ポリオキシエチレン基、アンモニウム基、アミド、カルボキシペタイン、糖類等を含有してもよく、これらの種類及び含有量で、粉体の機能を設計できる。さらに、その疎水部として、炭素原子数2～22の直鎖状または分岐アルキル、コレステロール等の環状アルキル、オレイル等不飽和結合を含むアルキル基、ベンゼン環、ナフタレン環、ピレンをはじめとする炭化水素系芳香族、ピリジル基、イミダゾール、チアゾール、インドール等のヘテロ系芳香族、パーカルオロアルキル、ポリアルキルシロキサン等の疎水基を含有してもよく、粉体の用途に応じて選択し、設計できる。合成ポリマー粉体の疎水基の結合形態は、エステル、エーテル、アミド、ウレタン、尿素結合等により直接ポリマー主鎖と結合されていても良いし、スペーサーを介して主鎖と結合されていても良い。スペーサーの種類としては、親水性のポリエチレンオキサイド、疎水性のポリプロピレンオキサイド、直鎖状アルキル（炭素原子数2～22）等が挙げられる。

[0 0 5 0]

本発明の改質粉体は、親水性及び保湿性に優れた粉体である。生体適合性を有する粉体として、化粧料、医用材料、クロマト用充填剤、塗料等の幅広い用途に応用可能である。

[0051]

「表面改質剤で処理された改質担体からなるクロマトグラフィー用充填剤」

本発明の表面改質剤により、担体表面を改質して容易に希望する量のホスホリルコリン基を有するクロマトグラフィー用充填剤を製造することが出来る。

具体的には、相体表面に存在する水酸基と、式(5)および(6)の化合物の $\text{Si}-\text{O}$

CH₃との脱水反応によってホスホリルコリン基を担体表面に導入する。

【0052】

式(5)および(6)の化合物のメタノール溶液(0.3mmol/mL)20mLに蒸留水20mLを加え、平均粒子径5μm、平均細孔径300オングストローム、比表面積100m²/gの球状高純度シリカゲルを4g添加する。この粉体分散液をオイルバース中80℃で還流し、5時間後に粉体をろ過し、メタノールで洗浄し、80℃で3時間減圧乾燥することでホスホリルコリン基を表面に直接有する粉体を容易に得ることができる。

反応溶媒は水-メタノール混合溶媒以外にも、水、エタノール、2-プロパノール等のプロトン性溶媒や、ジメチルスルホキシド、ジメチルホルムアミド、トルエン、ジエチルエーテル等の非プロトン性溶媒を使用でき、これらを单一、または組み合わせて用いることができる。

【0053】

なお、担体表面に水酸基が存在しない場合は、式(5)および(6)の化合物を揮発性溶媒に溶解させ、その溶液を物質表面に塗布、その後溶媒を乾燥させる方法が有効である。具体的には、式(5)および(6)の化合物のメタノール溶液(0.3mmol/mL)を物質の比表面積応じて適量を直接物質に塗布する。次に10℃から250℃の温度範囲でメタノールを気化させる。このとき、式(5)および(6)の化合物のSi-OCH₃どうしが脱水反応を起こし、Si-O-Si結合を生成し、物質表面を覆うことが可能である。この脱水反応は公知である。メタノールの揮発の際にこのように生成する膜は、ほとんどの物質表面に微量に存在する水酸基とも所々で結合を生じるために安定性の良好な表面改質を行うことができる。本法は水酸基を持たない物質のみならず、水酸基を有する物質についても極めて有効な表面改質法である。

【0054】

担体表面に先にアミノ基を導入してから、グリセロホスホリルコリンの酸化的解裂反応により得られるアルデヒド体を含有する化合物を導入させる方法と、本発明の表面改質剤を用いる方法との最大の相違点は、物体表面における未反応のアミノ基の有無である。

すなわち、本発明による表面改質剤を用いた場合は、物質表面に未反応のアミノ基を混在させることなくホスホリルコリン基だけを導入することができる。先にアミノ基を粉体に導入する場合は、2段階目のホスホリルコリン基を導入させる反応が、液相中のグリセロホスホリルコリンのアルデヒド体と固相表面のアミノ基とが反応しなければならず、表面に導入する場合に立体構造による立体障害、ホスホリルコリン基自体の立体のために拡散律速や固相表面の立体構造による立体障害、ホスホリルコリン基を導入する性等によって反応率が低い。約30%のアミノ基にしかホスホリルコリン基を導入することができない。残存したアミノ基は別の低分子化合物を結合させることによってある程度封鎖することができるが、物体表面の親水性を維持することが困難であるうえに全てを封鎖することはできない。

【0055】

また、物質表面にアミノ基が多く残存する場合、アミノ基は強い塩基性を有しているために、主に酸性のタンパク質が著しく強い電気的な相互作用を示し、そのほとんどが吸着してしまう。クロマトグラフィー用充填剤としてとらえた場合は当該タンパク質の回収率の悪化や、ピークの著しいテーリングの原因となる。さらに、タンパク質の吸着はその変性をもたらし、生体適合性素材としてとらえた場合は炎症の原因となり、好ましくない。

【0056】

これに対して、本発明による表面改質剤は、合成時、アミノ基を有する有機シラン化合物に対してホスホリルコリンのアルデヒド誘導体を過剰に添加し、双方を液相中で反応させる。アミノ基とアルデヒド基の反応性は非常に高く、アルデヒドを過剰に添加した場合はほぼ100%のアミノ基がアルデヒドと反応することが一般的に知られている。

したがって、本発明による表面改質剤には未反応のアミノ基は検出されない。このために本発明による表面改質剤を用いることで、物体表面に未反応のアミノ基を混在させることなくホスホリルコリン基だけを導入することができる。このことにより、固相上で2段

階の反応を行う方法よりも、極めて生体適合性に優れ、タンパク質の吸着の少ない粉体を得ることができる。

【0057】

また、球状粉体を液相に分散させることによって表面改質をする場合、強度の弱い粉体では攪拌中に粉体が崩壊する現象が知られている。本法では、一段階かつ短時間で直接ホスホリルコリン基を粉体に導入することが可能となるために、固相上で2段階の反応を行う方法よりも粉体の攪拌時間が4分の1以下で済み、より幅広い構造、素材の粉体に適用することが可能である。具体的には細孔径が1000オングストロームを越えるような機械的強度の弱い粉体についても粉体形状を損なうことなく表面改質を行うことができる。

【0058】

本発明で使用する担体には、シリカ、シリカゲル、活性炭、ゼオライト、アルミナ、粘土鉱物等の無機多孔質体、多孔質の有機高分子樹脂がある。担体は粉体が好ましい。好ましくは球型または破碎型多孔質シリカゲルである。球状多孔質シリカゲルの平均粒径は1～200μm、好ましくは1～10μm、球状多孔質シリカゲルの細孔の平均径が10～2000μm、好ましくは80～1000オングストロームで、比表面積は2000オングストローム、好ましくは80～1000オングストロームで、比表面積は0.01～800m²/g、好ましくは80～600m²/gである。

【0059】

本発明のクロマトグラフィー用充填剤をGFC用カラムとして使用すると、タンパク質やポリペプチドの吸着が極めて少なく、高い分離能力を発揮する。

すなわち、タンパク質およびポリペプチドの吸着を抑制することに優れたカラム充填剤である。したがって、タンパク質およびポリペプチドを分子量の違いによって分離するモード(GFCモード)に適用することが可能である。

【0060】

さらに、本発明のクロマトグラフィー用充填剤は、ホスホリルコリン基の有する双電荷によって試料の分子量の違いのみならず、試料の持つ微弱な電荷の違いに基づいた、より高い分離能力を有するカラム充填剤である。このように、双電荷を有する官能基がタンパク質の吸着を抑制するために導入された例は無く、本発明の表面処理剤によって製造されるクロマトグラフィー用充填剤はこれまでにない新しいGFC用カラム充填剤である。この電荷を有するという特徴によって、タンパク質やポリペプチドを分子量の違い以上にそれらが有する電荷に応じて分離できるだけでなく、移動相のpHや塩濃度を変化させることによって充填剤表面とタンパク質やポリペプチドとの相互作用の強さを制御することも可能であることを示している。したがって、移動相のpHや塩濃度を最適化することで目的とするタンパク質やポリペプチドを自在に保持させることができる。

GFCモードはタンパク質や酵素を失活させずにこれらを分離、精製できることから、未知生体試料の単離や医療用途の面でも本発明のカラム充填剤の高分離能が役立つことが期待される。

【0061】

本発明のクロマトグラフィー用充填剤は、具体的には、タンパク質およびポリペプチドの吸着が極めて少ない高分離能カラム充填剤として、例えばヒト血清中のタンパク質の分離、または、タンパク質をトリプシン消化して得られた試料に含まれるポリペプチドの分離、または生体中に含まれる未知タンパク質の活性評価に基づいた分離・分取に優れている。

【0062】

「表面改質剤で処理されたフィルター」

生体試料中に含まれるタンパク質等を分析する場合、生体由来の夾雑物を除去する前処理が必要となる。具体的には、血液中のタンパク質濃度を測定する場合、タンパク質が溶解している血清を得るために、血球や血小板などをろ過、もしくは遠心分離等を用いてあらかじめ除去する必要がある。血液などのろ過では、用いられるフィルターにタンパク質が吸着するためにタンパク質の定量性が低下するという問題がある。この他にも、遠心力が吸着するためにタンパク質の定量性が低下するという問題がある。この他にも、遠心力を用いて細孔の空いた膜を通過させる2層構造の容器がタンパク質試料の濃縮や脱塩、溶

媒置換等の目的で汎用されている。例えばUltrafree-MC 遠心式フィルターユニット（製品名）（日本ミリポア株式会社）が挙げられる。このフィルターユニットは上部に濃縮前の試料を入れ、下部が遠心分離器の外側を向くように設置し、5000Gほどの遠心力を加えることによりろ過を達成する。このような器具のろ過膜についてもタンパク質の回収率が50%近くまで下がる場合があり、良好ではないという課題がある。

【0063】

式（5）および（6）の化合物によってフィルター表面を改質することにより、タンパク質の吸着が極めて少ないフィルターを得ることができる。式（5）および（6）中のSi-OCH₃が、フィルター表面の水酸基と脱水反応を起こし、結合することで、簡便にタンパク質吸着抑制能力に優れたホスホリルコリン基を導入することができる。金属製、ガラス製、ガラス繊維製など、用いられているフィルターのほとんどの表面が酸化物に由来する水酸基を有しているために、幅広い素材に対して有効である。

【0064】

なお、水酸基を有しない素材の場合は、式（5）および（6）の化合物を揮発性溶媒に溶解させ、その溶液にフィルターまたはその素材を浸せきし、その後溶媒を乾燥させ、洗浄する方法が有効である。具体的には、式（5）および（6）の化合物のメタノール溶液（0.3mmol/mL）を物質の比表面積応じた適量に直接物質を浸ける。次に10℃から250℃の温度範囲でメタノールを気化させる。このとき、式（5）および（6）の化合物のSi-OCH₃どうしが脱水反応を起こし、Si-O-Si結合を生成し、物質表面を覆うことが可能である。この脱水反応は公知である。メタノールの揮発の際にこのように生成する膜は、ほとんどの物質表面に微量に存在する水酸基とも所々で結合を生じるために比較的強靭な表面改質を行うことができる。本法は水酸基を持たない物質のみならず、水酸基を有する物質についても極めて有効な表面改質法である。

【0065】

フィルターのような微細孔を有する物体をホスホリルコリン基で表面処理する場合は、既に公知化されているホスホリルコリン基を有するポリマーでコートすることは困難である。ポリマーが微細孔を塞いでしまい、フィルターとしての能力を低下させてしまうことが主な原因である。式（5）および（6）のような低分子を用いることで、微細孔といった担体の構造特性を損なうことなく担体表面を改質させることができた。さらに、担体表面とは物理吸着ではなく、化学結合を生成させることができるので耐久性の面でも大変優れている。

【0066】

「表面改質剤で処理されたガラス製実験器具」

ガラス製実験器具とは、保存容器、計量用器具、セル、分取用チップ、サンプル分取用シリソジ等の実験器具である。本発明の表面改質剤を用いて処理した場合は、タンパク質吸着が極めて少ない実験器具を得ることができる。

【実施例】

【0067】

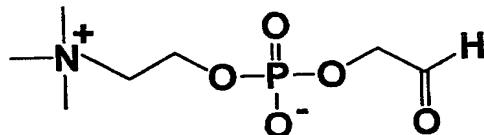
次に本発明を実施例に基づきさらに詳しく説明する。なお、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【0068】

「合成例1 ホスホリルコリン基を含有するアルデヒド化合物」

L- α -グリセロホスホリルコリン（450mg）を蒸留水15mLに溶解し、氷水浴中で冷却した。過ヨウ素酸ナトリウム（750mg）（和光純薬工業株式会社）を添加し、5時間攪拌した。反応液を減圧濃縮、減圧乾燥し、メタノールにより目的物を抽出した。下記化合物（8）に構造を示す。式（8）の化合物の¹H NMRスペクトルを図1に、Massスペクトルを図18に示す。

【化22】



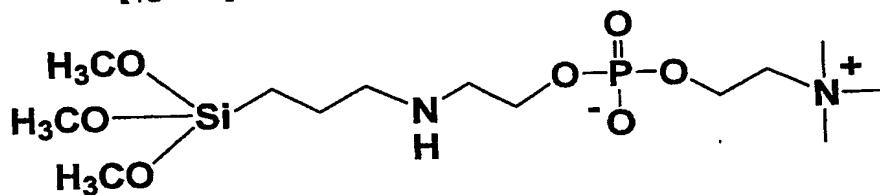
(8)

【0069】

「実施例1：式（5）および（6）の化合物の製造」

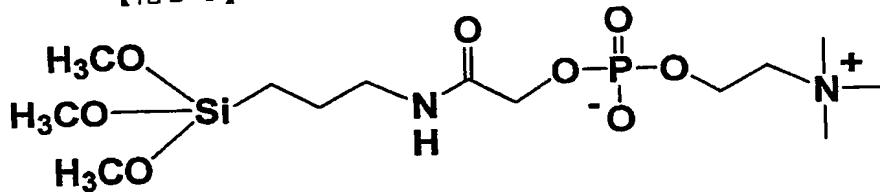
合成例1の化合物7.5 gを脱水したメタノール30 mLに溶解させ、容器内を乾燥窒素で置換する。次に、化合物1のメタノール溶液に3-アミノプロピルトリメチルシリラン（信越化学工業株式会社）を3.6 g添加した。この混合溶液を、室温で5時間攪拌したのち、氷冷し、シアノヒドロホウ素化ナトリウム（和光純薬工業株式会社）2.5 gを添加し、室温に戻して16時間攪拌した。この間も反応容器には乾燥窒素を流し続けた。沈殿をろ過した後、目的物質である下記式（10）および（11）の化合物のメタノール溶液を得た。

【化23】



(10)

【化24】



(11)

【0070】

「実施例2：改質粉体の製造」

実施例1で製造した式（10）および（11）の化合物を含むメタノール溶液に蒸留水35 mLを加え、さらに平均粒子径 $5 \mu\text{m}$ 、平均細孔径 30 nm で比表面積が $140 \text{ m}^2/\text{g}$ のシリカゲルを 14 g 添加した。この粉体分散溶液を 80°C で 5 h 還流した。還流後メタノール 100 mL でろ過洗浄し、目的物質を得た。

【0071】

以上の手順で、実施例1の表面改質剤で処理した改質粉体の元素分析値を「表1」に示す。表中のC%またはN%とは、粉体に含まれる炭素元素または窒素元素の質量%を示している。この値から、実施例1の表面改質剤による処理後の粉体の炭素と窒素の原子数比（C/N）は 5.08 となる。式（10）および（11）の表面改質剤のメトキシ基部位が全て結合した後のC/Nは 5 であるから、表面改質剤が破壊されることなく粉体に導入されたことを示している。

[0072]

【表1】

	元素分析値	
	C%	N%
表面改質剤処理前の粉体	0.06	0.03
表面改質剤処理後の粉体	3.95	0.91

[0073]

また、このシリカゲルの ^{13}C -CPMASスペクトルおよび ^{13}C -PSTMASスペクトルを図2に示す。PSTMASスペクトルとは自由運動をしている分子鎖のスペクトルを選択的に得る手法で、粉体表面の修飾鎖の解析に広く用いられている手法である。図2では、54.2 ppmにコリン基の炭素に起因するスペクトルが観測される。

[0074]

一方、図3に示した同シリカゲルの ^{31}P -CPMASスペクトルでは、対象として測定した NaH_2PO_4 とほぼ同じ化学シフト値にピークが検出されたことから、リン酸基の存在を確認することができる。図2によってコリン基の存在が、また図3によってリン酸基の存在が確認されたことから、ホスホリルコリン基を担体シリカゲル表面に導入することができたと考えられる。

[0075]

さらに、図2からは、ケイ素原子とホスホリルコリン基の間に存在するプロピルの炭素に起因するスペクトルが9 ppm、23 ppm付近に観測され、ホスホリルコリン内のエチルに由来するスペクトルは60 ppm、69 ppm付近に観測される。以上のことから、式(5)および(6)の構造が破壊されることなく、シリカゲルに導入できていることが分かる。なお、ホスホリルコリン基とプロピルトリメトキシシランの結合部分は式(5)に示した2級アミンのものと、式(6)に示したアミド結合のものが混在している。

[0076]

図4に本実施例で合成した改質粉体のFT-IRスペクトルを示す。1650cm⁻¹附近にアミド結合に特有の吸収を観測することができた。

[0077]

「審議例3・クロマトグラフィー用充填剤」

実施例2で製造した改質粉体を、担体として、通常のスラリー法により、内径4.6mm、長さ250mmのエンプティカラムに充填した。クロマトグラムの取得条件は次の通りである。

移動相: 50 mmol/L リン酸バッファー + 500 mmol/L NaCl pH 6

卷之三

• 6

温度: 35°C

温度：25℃

横出：UV 280 nm
[6.673]

[0078]

実施例3のカラムを本条件で用いた場合の校正曲線を図5に示した。図5に示した校正曲線は測定範囲で極めて直線性が良い。タンパク質の吸着が少ないために、充填剤表面とタンパク質との相互作用が極めて小さく、結果として分子量の大きい分子から早く溶出するGFCモードでの分離が行われたことが分かる。次に、上記条件でヒト血清タンパク質を分離した結果を図6に示す。

試料として用いたのはコンセーラN(製品名)を蒸留水により2倍希釈したもので、2 μ Lを注入した。ヒト血清のような実試料でも分子量順のGFCモードでの分離が行われており、大変実用性が高いことが分かる。

【0079】

「比較例1」

次に、市販品のクロマトグラフィー用カラム (Shodex PROTEIN KW803、昭和電工株式会社製) を市販の状態のまま用いてヒト血清試料 (コンセーラN (製品名) を蒸留水にて二倍に希釈した) 中のタンパク質の分離を試みた。比較例で挙げた本品名) を蒸留水にて二倍に希釈した) 中のタンパク質の分離を試みた。比較例で挙げた本品名) を蒸留水にて二倍に希釈した) 中のタンパク質の分離を試みた。比較例で挙げた本品名) を蒸留水にて二倍に希釈した) 中のタンパク質の分離を試みた。

カラムは、実施例3で述べたカラムと同じ内径と長さである。
この充填剤は多孔性シリカゲルの表面に、親水性基を化学結合させたサイズ排除モード用の充填剤であると説明されている。平均細孔径300オングストローム、平均粒子径5 μ mであり、実施例1で述べた充填剤との比較に好適である。分子量1万から数十万のタンパク質の分離に適していると説明されている。

Shodex PROTEIN KW803は、非解離性の親水性基を用いているために、本願発明の表面改質剤を用いて調製した充填剤と違って電荷を帯びた官能基を有していない。したがってタンパク質とのイオン的な相互作用はほとんど無いと考えられる。

実施例3と同様に、50mmol/1リン酸バッファー (Na₂HPO₄およびKH₂PO₄から調製) に500mmol/1の塩化ナトリウムを加えた移動相を用い、流速を0.1ml/min、カラムオーブン温度25℃にてヒト血清試料 (コンセーラN (製品名) を純粹にて二倍に希釈した) のタンパク質の分離を試みた。検出はUV 280nmで行った。結果を図7 (b) に示す。

なお、比較のために、図7 (a) には実施例3で得た本願発明の表面改質剤を用いて調製した充填剤での同条件、同試料でのクロマトグラムを示した。

さらに図8 (a) に、本願発明の表面改質剤を用いて調製した充填剤を、塩濃度150mMで適用した場合のクロマトグラムを、図8 (b) にはShodex PROTEIN KW803を塩濃度150mMで適用した場合のクロマトグラムを示す。図8での塩濃度以外の条件は図7と同様である。

【0080】

本願発明の表面改質剤を用いて調製した充填剤を使用したクロマトグラム (図7 (a))においては、ヒト血清において主要なタンパク質である γ -グロブリンとアルブミンの他に、トランスフェリンのピークがショルダー状に確認されていることが大きな特徴である。ピークの帰属は単離された各タンパク質の市販品を用いて行った。

【0081】

これに対して、従来のGFC用充填剤を使用した場合は (図7 (b)) 、アルブミンとトランスフェリンが全く分離されない。これは、単離された市販品の各タンパク質の溶出時間が同じであったことから確認された。

アルブミンとトランスフェリンの分子量はそれぞれ、約69,000と75,000であり、非常に似通っている。従来のGFC用カラムではアルブミンとトランスフェリンのような分子量の近い試料を分離することはできない。本願発明の表面改質剤を用いて調製した充填剤はタンパク質の吸着が極めて少ないだけでなく、ホスホリルコリン基の持つ双電荷によってタンパク質と微弱なイオン的相互作用を持つために、分子量の近いタンパク質についても等電点や疎水性の違いに基づいて分離することができる。

すなわち、本発明のクロマトグラフィー用充填剤はGFCモードにおいて、分子量の違いだけでなくタンパク質の持つ等電点や疎水性の違いに応じて試料を分離することができる。ことが分かる。

【0082】

本願発明の表面改質剤を用いて調製した充填剤が微弱なイオン交換相互作用を有していることは、移動相の塩濃度を下げるこによって確認することができる。

移動相の塩濃度が500mMである図7 (a) では、本願発明の表面改質剤を用いて調製した充填剤でもトランスフェリンはアルブミンのピークのショルダーとして認識される程度であるが、移動相の塩濃度を150mMに下げた図8 (a) ではトランスフェリンとアルブミンのピークはベースライン分離を達成している。

さらに、図8 (a) では数多くのタンパク質によるピークを確認することができる。

般に、充填剤表面と移動相内の物質間に働くイオン交換相互作用は、移動相の塩濃度が小さくなるほど強くなることが知られている。これは、移動相の塩濃度が小さくなるほどイオン交換相互作用を受ける物質は強く保持されることを意味している。本願発明の表面改質剤を用いて調製した充填剤は、移動相の塩濃度を小さくすることで特にアルブミンに強い保持を生じさせ、トランスフェリンとの完全分離を達成した。

図7、図8のような中性pH下で負に帯電しているアルブミンを低塩濃度にて保持したことから、本願発明の表面改質剤を用いて調製した充填剤がアニオン交換モードを有していることが推察される。

【0083】

そこで次に、乳酸、酢酸、コハク酸、マロン酸、クエン酸の5種類の有機酸を用いて、本願発明の表面改質剤を用いて調製した充填剤の持つアニオン交換能を評価した。評価条件は次の通りである。結果を図9に示す。

カラム：4.6×150mm

移動相：50mmol/L リン酸バッファ (pH 6.8)

流速：1000mL/min

検出：UV 210nm

【0084】

図9によれば、本願発明の表面改質剤によって調製された充填剤は、カルボン酸の数に応じて各種の有機酸を分離することができた事がわかる。

具体的には、5種のカルボン酸に起因する各ピークを帰属すると、カルボン酸を1つ持つ有機酸2種が最も早く溶離し、次にカルボン酸を2つ持つ有機酸2種が溶離し、最後にカルボン酸を3つ持つクエン酸が溶離している。カルボン酸の数が増えるほど保持が大きくなる傾向が認められることから、この充填剤がアニオン交換能を有していることは明確である。したがって、本願発明の表面改質剤によって処理された粉体はアニオン交換用充填剤としても非常に有効であると言える。以上に示したイオン交換性はタンパク質を吸着する、変性させるほどの強さは無く、回収率良くユニークな分離をするために適している。

【0085】

一方、一般的なGFC用カラムであるShodex PROTEIN KW803は、図8(b)に示したように、150mMの塩濃度においてもトランスフェリンとアルブミンを分離することはできない。

本願発明の表面改質剤を用いて調製した充填剤は、タンパク質の吸着を抑制するという優れた機能によるGFCモード(サイズ排除モード)に加え、イオン交換モードも存在する極めてユニークな充填剤である。タンパク質の吸着が極めて少ないと、タンパク質が変性することなく、酵素の活性を保ったまでのタンパク質の分離、精製が可能である。しかも、GFCモードだけではなくイオン交換モードが混在するために、移動相の塩濃度やpHに応じて分離を制御することができる極めて画期的な充填剤である。

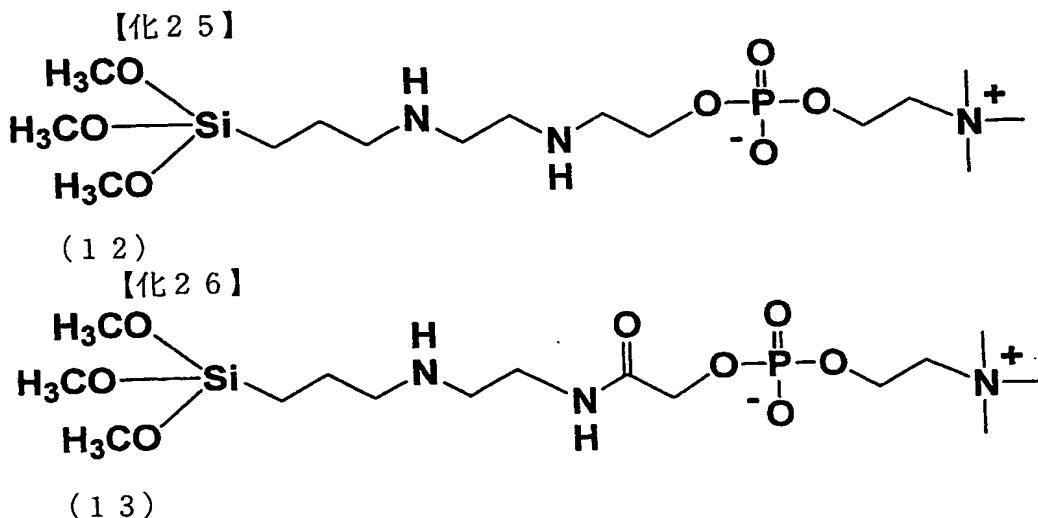
【0086】

「実施例4 クロマトグラフィー用充填剤」
(ケイ素原子とホスホリルコリン基の間に窒素原子を二つ有する、式(1)中Rが式(4) p=1で表される化合物での表面改質)

合成例1の化合物7.5gを脱水したメタノール30mLに溶解させ、容器内を乾燥窒素で置換する。次に、化合物1のメタノール溶液に3-(2-アミノエチルアミノプロピル)トリメトキシラン(信越化学工業株式会社)を3.6g添加した。

この混合溶液を、室温で5時間攪拌したのち、氷冷し、シアノヒドロホウ素化ナトリウム2.5gを添加し、室温に戻して16時間攪拌した。この間も反応容器には乾燥窒素を流し続けた。

沈殿をろ過した後、目的物質である下記式(12)、(13)の化合物のメタノール溶液を得た。



【0087】 式(12)および(13)の化合物を含むメタノール溶液に蒸留水35mLを加え、さらに平均粒子径5μm、平均細孔径30nmで比表面積が140m²/gのシリカゲルを14g添加した。この粉体分散溶液を80℃で5h還流した。還流の後メタノール100mLでろ過洗浄し、目的物質を得た。

【0088】
図10(b)に、式(12)および(13)を導入したシリカゲルを通常のスラリー法により充填し、ヒト血清試料(コンセーラN(製品名)を蒸留水にて二倍に希釈した)を注入した時のクロマトグラムを示した。

図10 (a) は実施例3で調整した粉体を用いた場合のクロマトグラムである。実施例3と本実施例の違いは、表面改質剤のスペーサー部分の2級アミンの数が異なることである。なお、図10 (a) と (b) で使用したシリカゲルは同一の物である。

ケイ素原子とホスホリルコリン基の間に2級アミンを図10(a)よりも一つ多く持つ図10(b)では、トランスフェリンとアルブミンの分離がさらに改善されていることが分かる。これはケイ素原子とホスホリルコリン基の間に2級アミンが挿入されたことで修飾基の塩基性が増大し、酸性タンパク質であるアルブミンがより強く保持されたためであると考えられる。

このように、本願発明の表面改質剤は、ホスホリルコリン基によるタンパク質吸着抑制効果に加え、ケイ素原子とホスホリルコリン基の間のスペーサーの性質を変えることで、イオン交換性、疎水性、親水性、水素結合性といった相互作用を付与させることが可能である。

[0089]

「審査例5・ホウケイ酸ガラス纖維フィルター材料」

＜実施例5：ホウケイ酸ガラス繊維／ナスカリルコリン基結合ホウケイ酸ガラス繊維フィルター材料の調製＞

100mL三角フラスコに蒸留水20g、実施例1で製造した式(10)および(11)の化合物(約0.4mmol)を含むメタノール溶液1.0mLを入れ振り混ぜた。これにワットマンジャパン株式会社製ホウケイ酸ガラス纖維フィルター(ガラス纖維ろ紙グレードGF/F、直径25mmφ、1枚あたり約0.070g)8枚を添加後、100℃に加熱し5時間還流煮沸した。室温に冷却後、フィルターをろ過、洗净し、80℃で3時間減圧乾燥してホスホリルコリン基を表面に直接有するホウケイ酸ガラス纖維フィルターを得た。

[0090]

＜フィルター材料のタンパク質吸着抑制効果の測定＞

ウシ血清アルブミン (BSA) 10 mg をリン酸緩衝液 100 mL (タカラバイオ社製 PBS タブレット 1 錠を蒸留水に溶解し、全量を 100 mL としたもの。pH 7.4~7

5) に溶解し BSA 溶液とした。ポリプロピレン製 30 mL サンプル管 3 本に調製した BSA 溶液を 2.0 g ずつ取り、このうち 1 本のサンプル管に実施例 6 で調製したホウケイ酸ガラス纖維フィルターを、別の 1 本のサンプル管に未処理のホウケイ酸ガラス纖維フィルターを入れ浸漬させた。これを 24 時間室温 (25°C) で放置し、Lowry 法にてそれぞれ 3 本のサンプル管中の BSA 溶液を発色、吸光光度分析することによりフィルター 1 枚あたりの BSA 吸着量を定量分析した (表 2)。

本発明のホウケイ酸ガラス纖維フィルターは未処理品と比較して BSA 吸着量が低減されていることがわかった。

【0091】

【表 2】

サンプル	BSA 吸着量 (μg/枚)
未処理ホウケイ酸ガラスフィルター	37.8
PC 処理ホウケイ酸ガラスフィルター	7.8

【0092】

上記結果から、本発明はタンパク質やポリペプチドの吸着が極めて少ないフィルター材料を提供できることが分かる。

本発明のフィルター材料は、抗体、酵素などの分離、濃縮や血液透析、血液フィルターなどの血液浄化、分析等の広範囲な生体物質のろ過に有用である。

【0093】

「実施例 6：ガラス製バイアル」

〈ホスホリルコリン基結合ガラスバイアルの調製〉

100 mL 三角フラスコに蒸留水 20 g、実施例 1 で製造した式 (10) および (11) の化合物 (約 0.4 mmol) を含むメタノール溶液 1.0 mL を入れ振り混ぜた。これに日本ウォーターズ株式会社製ガラス製バイアルである、12 × 32 mm ガラスバイアルスクリュー式 10 個を添加後、100 °C に加熱し 5 時間還流煮沸した。室温に冷却後、バイアルをメタノールで洗浄し、80 °C で 3 時間減圧乾燥してホスホリルコリン基を表面に直接有するガラスバイアルを得た。

このように、本発明の表面改質剤により、タンパク質吸着が極めて少ないガラス製実験器具実験器具を得ることができる。タンパク質の吸着を抑制できない一般的なバイアルでは、実験操作中にタンパク質の試料濃度が経時で減少することが知られている。具体的には、保存容器から液体高速クロマトグラフィーに試料を注入する場合、毎回同量の体積を注入しているにもかかわらず経時でピーク面積が減少するという現象が知られている。本実施例で製造したガラス製バイアルは、タンパク質の吸着抑制に優れているためにこのような現象を回避することができる。

なお、高分子を容器内面に吸着させてタンパク質の吸着を抑制する場合は、試料に有機溶媒が含まれると高分子の脱着が起こり、耐久性に問題があることが知られている。高分子による表面被覆は、高分子とポリプロピレン容器のような基材との間の疎水性相互作用による吸着により実現している。試料溶媒中に有機溶媒が含まれると高分子と基材の間の疎水性相互作用が弱まり、高分子が剥離する。一方、本発明の表面改質剤 (シランカップリング剤) は、化学結合にて表面修飾を行えるので、試料中の溶媒の影響を実質的に受けることなく、効果を持続することができる。

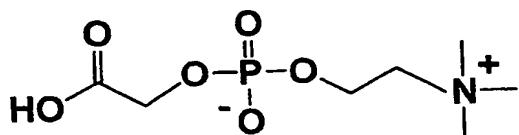
【0094】

「実施例 7：カルボキシル基を有するホスホリルコリン誘導体の製造」

200 mL フラスコ内に、グリセロホスホリルコリン 5 g (19.4 mmol)、過ヨウ素酸ナトリウム 17 g (79.7 mmol, 4.1 eq) (和光純薬工業株式会社)、3 塩化ルテニウム (水和物) 81 mg (0.39 mmol, 0.02 mol eq) (和光純薬工業株式会社)、および、イオン交換水 70 g、アセトニトリル 30 g を加える。室温にて 2 時間攪拌した後、ろ過し、濾液から溶媒を除去する。得られた固体物からメタノールに

て目的物を抽出、続いてメタノールを除去することによって式(9)に示すカルボキシル基を有するホスホリルコリン誘導体を得た。式(9)の化合物の¹H NMRスペクトルを図16に、Massスペクトルを図17に示す。

【化27】



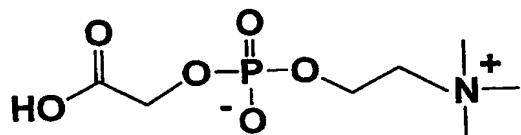
(9)

【0095】

「実施例8：ケイ素原子とホスホリルコリン基の間にアミド結合を有する、式(1)中Rが式(3) L=2で表される有機シラン化合物（シランカップリング剤）」

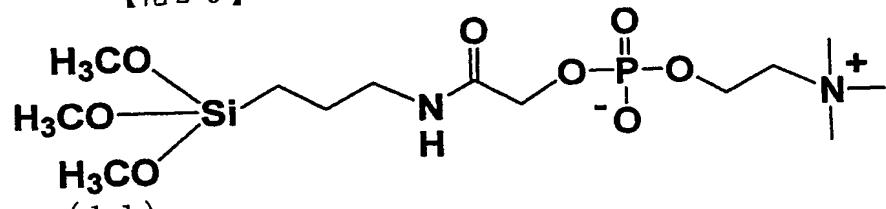
上記式(9)の化合物3g(12.4mmol)を脱水したメタノールに100mlに溶解させ、容器内を乾燥窒素で置換する。次に、3-アミノプロピルトリメトキシシラン1.1g(6.2mmol)、N-ヒドロキシスクシンイミド1.4g(12.4mmol)およびN-エチル-N'-3-ジメチルアミノプロピルカルボジイミド2.4g(12.4mmol)を添加し、-10℃で16時間反応させ、下記式(11)に示すアミド結合をスペーサーに有し、ホスホリルコリン基を末端に有する有機シラン化合物含む溶液を得た。

【化28】



(9)

【化29】



(11)

また、上記式(9)に示した化合物の代わりに、ホスホリルコリン基とカルボキシル基の間に炭素数5の飽和アルキル鎖を有するO-ホスホリルコリンヒドロキシヘキサン酸を用いることで、同様の手順により式(1)中Rが式(3) L=6で示される化合物を得ることができる。

【0096】

本発明の表面改質剤は、精製を行わなくともホスホリルコリン基を基材に固定化することができる。しかし、例えば、下記の方法で精製することもできる。

<精製方法>

得られた溶液を減圧濃縮し、これを蒸留水に溶解させる。この水溶液を試料とする。疎水性相互作用とカチオン交換能を有する高速液体クロマトグラフィー用カラムである、カラムパック SCX UG80 S-5(サイズ: 4.6mm i. d. × 250mm)(株式会社資生堂)をHPLC装置に接続し、0.2mmol/Lのリン酸緩衝液(pH3.5)を1mL/分の流速で流して平衡化させたのちに、試料を10μL注入する。検出器として示差屈折計を用いることでクロマトグラムを得られ、目的とする化合物を単離することができる。

【0097】

「実施例9：アミド結合をスペーサーに有し、ホスホリルコリン基を末端に有する有機シ

「ラン化合物によって処理された改質粉体」

実施例8で製造した式(11)の化合物を含む溶液30mL(0.25mmol/mL)に蒸留水35mLを加え、さらに平均粒子径5μm、平均細孔径30nmで比表面積が140m²/gのシリカゲルを14g添加した。この粉体分散溶液を80℃で5h還流した。還流の後メタノール100mLでろ過洗浄し、目的物質を得た。以上の手順で得られた実施例8の表面改質剤で処理した改質粉体(処理前の炭素含有量0.15%)の炭素含有量は2.49%であった。

【0098】

「リンの定量によるPC基導入の確認」

実施例9で製造したホスホリルコリン基を表面に有する改質粉体のリン元素の定量を行った。本発明の製造方法においてリン元素はホスホリルコリン基固有の元素であり、粉体表面に存在するリン元素を定量することで実際にホスホリルコリン基の導入を確認することができる。

リン元素の定量はモリブデン酸発色法によって行った。以下に定量方法を説明する。

- (1) 所定量の粉体を十分洗浄した試験管に計りとる。
- (2) 1の粉体に60%過塩素酸水溶液(和光純薬工業株式会社)を3mL添加する。
- (3) 液の気散を避けるため、2の試験管上部に冷却管を取り付け、120℃で1時間、次いで180℃で2時間加熱する。本操作にて粉体表面の修飾鎖をすべて酸化させ、特にリン元素についてはリン酸として遊離させる。
- (4) 3の溶液を遠心分離機にかけ(3000rpm、5分)、上清を1mLサンプルチューブに移す。
- (5) 4の溶液に蒸留水1mLと0.5Mのモリブデン酸ナトリウム(和光純薬工業株式会社)を500μL、および0.5Mのアスコルビン酸を500μL添加する。
- (6) 5の溶液を95℃の湯浴にて5分間熱し、その後冷水で冷却する。
- (7) 6の発色済み溶液を96穴プレートに200μL滴下し、プレートリーダにて70nmにおける発色強度を測定する
- (8) あらかじめ既知の濃度のリン酸溶液の発色強度から得た検量線を元に、サンプルに含まれるリン元素の量を定量する。リン酸の標準溶液は和光純薬工業株式会社より入手できる。

【0099】

この結果、実施例9で製造したホスホリルコリン基を表面に有する改質粉体のリン元素は0.13mmol/g_{gel}であった。すなわち0.13mmol/g_{gel}のホスホリルコリン基を粉体表面に固定化することができたことが分かる。

【0100】

図11に本実施例で合成した改質粉体のFT-IRスペクトルを示す。

1650cm⁻¹付近にアミド結合に特有の吸収を観測することができた。

【0101】

「実施例10：アミド結合をスペーサーに有し、ホスホリルコリン基を末端に有する表面改質剤(シランカップリング剤)によって処理された液体クロマトグラフィー用充填剤」

実施例9で合成した改質粉体を担体として、通常のスラリー法により、内径4.6mm、長さ250mmのエンプティカラムに充填した。クロマトグラムの取得条件は次の通りである。

移動相：50mmol/L リン酸バッファー + 500mmol/L NaCl pH 6.9

流速：200μL/min

温度：25℃

検出：UV 280nm

【0102】

まず、α2マクログロブリン0.67mg/mL(分子量約800,000、略号α2M)、γ-グロブリン1.3mg/mL(分子量約160,000、略号γG)、ヒト

血清アルブミン 1.7 mg/mL (分子量約 70,000、略号 HSA)、リゾチーム 0.3 mg/mL (分子量約 14,000、略号 LYZ)、ウラシル 0.017 mg/mL (分子量 112、略号 U) を混合した水溶液試料を 2 μL 注入したときのクロマトグラムを図 12 に示す。α 2M、γ-G、HSA、LYZ はシグマ アルドリッヂジャパン株式会社より、ウラシルはナカライテスク株式会社よりそれぞれ入手した。5 本のピークが明確に確認され、これらを市販の単品試料の溶出時間から同定したところ、溶出順序の早い順に α 2M、γ-G、HSA、LYZ、U であった。5 本のピーク以外に観測された小さいピークは市販の標準サンプルに含まれる不純物である。アミド結合を介してホスホリル基がシリカゲル上に固定されたことによってタンパク質の吸着が少ないとするために、充コリン基がシリカゲル上に固定されたことによってタンパク質の吸着が少ないとするために、充填剤表面とタンパク質との相互作用が極めて小さく、結果として分子量の大きい分子から早く溶出する GFC モードでの分離が行われたことが分かる。

アミド結合は親水性が良好である。タンパク質の吸着を抑制するという観点では物質表面を親水性で、かつ非イオン性の官能基で覆うことが望ましい。ホスホリルコリン基は双性イオン固有の極めて優れた親水性と、双性イオンの電荷バランスの釣り合いから実質的なイオン性は非常に微弱であり、タンパク質の吸着抑制に優れた官能基であるといえる。しかしながら、ホスホリルコリン基を物質表面に固定化させるために用いるスペーサーの疎水性が高いとタンパク質の非特異的不可逆吸着を誘発する。したがって、スペーサーにアミド結合が存在することは極めて重要で、より親水的な表面改質を実現するものである。このスペーサーまでも含めた親水性がタンパク質の吸着抑制において極めて効果的である。

【0103】

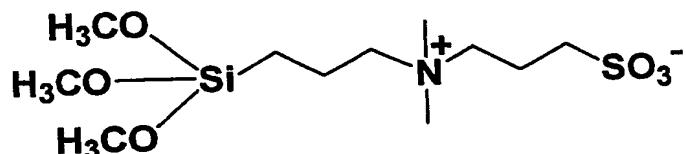
＜ペタイン構造の表面改質剤との比較例（先行技術との比較）＞

「比較例 2」

ホスホリルコリン基とは異なるペタイン構造を有する有機シラン系表面改質剤について特開平 5-222064 号公報には式 (14) に示すスルホベタインを有するシラン化合物が開示されている。また、特開昭 63-295593 号公報には、式 (15) に示すカルボキシベタインを有するシラン化合物が開示されている。

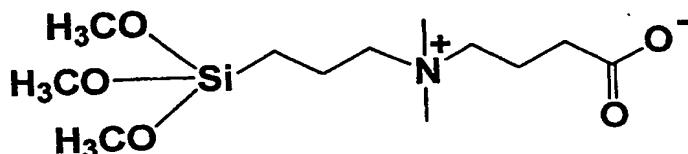
式 (14) および (15) のシラン化合物と、実施例 1 の式 (10) および (11) の化合物との比較を行った。

【化 30】



(14)

【化 31】



(15)

【0104】

式 (14) および (15) の化合物の製造方法は該当する公知文献に従った。

次に、式 (14) の化合物 2.0 g にメタノール 20 mL と蒸留水 20 mL を加え、さらに平均粒子径 5 μm、平均細孔径 30 nm で比表面積が 140 m²/g のシリカゲルを 5.0 g 添加した。この粉体分散溶液を 80 °C で 5 h 還流させ、式 (14) に示した化合物のシリカゲル上への固定化を行った。還流の後メタノール 50 mL でろ過洗浄し、式 (14) に示した化合物によって表面改質されたシリカゲルを得た。

式(15)に示した化合物についても同様の操作を行い、式(15)に示した化合物によって表面改質されたシリカゲルを得た。

続いて、得られた表面改質シリカゲルをそれぞれ通常のスラリー法により、内径4.6 mm、長さ250mmのエンプティカラムに充填した。クロマトグラムの取得条件は次の通りである。

移動相: 50 mmol/L リン酸バッファー + 500 mmol/L NaCl

pH 6.9

流速: 200 μL/min

温度: 25°C

検出: UV 280 nm

【0105】

まず、実施例3のホスホリルコリン基を表面に有する充填剤を充填したカラムに対して、 α 2マクログロブリン0.67mg/mL(分子量約800,000、略号 α 2M)、 γ -グロブリン1.3mg/mL(分子量約160,000、略号 γ G)、ヒト血清アルブミン1.7mg/mL(分子量約70,000、略号HSA)、リゾチーム0.3mg/mL(分子量約14,000、略号LYZ)、ウラシル0.017mg/mL(分子量112、略号U)を混合した水溶液試料を 2μ L注入したときのクロマトグラムを図13に示す。 α 2M、 γ -G、HSA、LYZはシグマアルドリッヂジャパン株式会社より、ウラシルはナカライテスク株式会社よりそれぞれ入手した。

5本のメインピークが明確に確認され、これらを単品試料の溶出時間から同定したところ、溶出順序の早い順に α 2M、 γ G、HSA、LYZ、Uであった。これまで述べてきたように分子量の大きい物から溶出するGFCモードである。5本のピーク以外に観測された小さなピークは市販されている標準タンパク質に含まれる不純物である。

【0106】

一方、式(14)で示したスルホベタインを固定化した充填剤を充填したカラムに対して同じ試料を注入したときのクロマトグラムを図14に示した。5種類の物質のうちヒト血清アルブミンとウラシルしかピークが観測されず、特にリゾチームについてはこの試料濃度において溶出を確認することができなかった。スルホベタインを構成する4級アンモニウムとスルホン酸の間で電気的な中性が達成されず、先端に存在する強酸であるスルホン酸に起因するカチオン交換能が発現した結果、中性で正電荷を有するリゾチームとの間に極めて強いイオン交換相互作用が生じたためである。

【0107】

式(15)で示したカルボキシベタインを固定化した充填剤を充填したカラムに対して同じ試料を注入したときのクロマトグラムを図15に示した。5種類のピークはスルホベタインを固定化したカラムの場合に比べて良好に溶出しており、 α 2M、 γ -グロブリン、リゾチーム、ウラシル、ヒト血清アルブミンの順で溶出した。着目すべきことに中性移動相下で負に帯電しているヒト血清アルブミンが特徴的に保持され、低分子であるウラシルよりも後に溶出した。これはカルボキシベタインを構成する4級アンモニウムとカルボキシル基との間で電気的な中性が達成されず、相対的にイオン性の強い4級アンモニウムによる強いアニオン交換性が発現したため、中性で負電荷を有するヒト血清アルブミンとの間に極めて強いイオン交換相互作用が生じたためである。

【0108】

このように、一般的によく知られているベタインはイオン的に完全に中性ではない。例に挙げたスルホベタインやカルボキシベタインのようなベタイン構造は優れた親水性を有しているが、強すぎるイオン交換性によってタンパク質の吸着を誘発する。そのなかでホスホリルコリン基はリン酸と4級アンモニウムの電荷のバランスが適切で、ベタイン構造固有の極めて優れた親水性と、非イオン性というタンパク質吸着を抑制する機能に優れていることが分かる。

以上から、これまで報告例がない、ホスホリルコリン基を有する有機シラン系表面改質剤(シランカップリング剤)は、タンパク質非吸着を目的とした物質表面改質に極めて有効である。

効であると言える。本発明の表面改質剤を用いることで、タンパク質の吸着が少なく生体適合性に優れた表面改質を施すことができる。

【産業上の利用可能性】

【0109】

本発明のホスホリルコリン基を含有する新規化合物は、表面改質剤として有用である。本発明の表面改質剤は、生体適合性、保湿性、その他に様々な有用な機能を物体に付与する。本発明の表面改質剤により、ホスホリルコリン基により改質される改質粉体、該改質粉体を担体として利用したクロマトグラフィー用充填剤、該表面改質剤により改質されたフィルター、該表面改質剤により改質されたガラス器具が容易に製造できる。

【図面の簡単な説明】

【0110】

【図1】合成例1で製造した化合物の構造式及び¹H-NMRスペクトルである。

【図2】実施例2で製造した改質粉体の¹³C-CPMASスペクトルである。

【図3】実施例2で製造した改質粉体の³¹P-CPMASスペクトルである。

【図4】実施例2で製造した改質粉体のFT-IRスペクトルである。

【図5】実施例3で製造した液体クロマトグラフィー用充填剤をGFCモードで用いた場合の校正曲線である。

【図6】実施例3で製造した液体クロマトグラフィー用充填剤を使用してヒト血清タンパク質の分離を行った時のクロマトグラムである。

【図7】移動相塩濃度500mMにおいてヒト血清タンパク質の分離を行ったときのクロマトグラムである。(a) 本願発明の表面改質剤を用いて合成した充填剤。(b) Shodex PROTEIN KW803。

【図8】移動相塩濃度150mMにおいてヒト血清タンパク質の分離を行ったときのクロマトグラムである。(a) 本願発明の表面改質剤を用いて合成した充填剤。(b) Shodex PROTEIN KW803。

【図9】本願発明の表面改質剤を用いて合成した充填剤を用いて5種の有機酸を分離したときのクロマトグラムである。

【図10】本願発明の表面改質剤のスペーサー部分に2級アミンを挿入した場合の、ヒト血清タンパク質の分離を行ったときのクロマトグラムである。

【図11】実施例9で合成した改質粉体のFT-IRスペクトルである。

【図12】実施例10で製造した液体クロマトグラフィー用充填剤によるクロマトグラムである。

【図13】実施例3で製造した液体クロマトグラフィー用充填剤によるクロマトグラムである。

【図14】比較例2で製造した式(14)で示した化合物によって表面改質された液体クロマトグラフィー用充填剤によるクロマトグラムである。

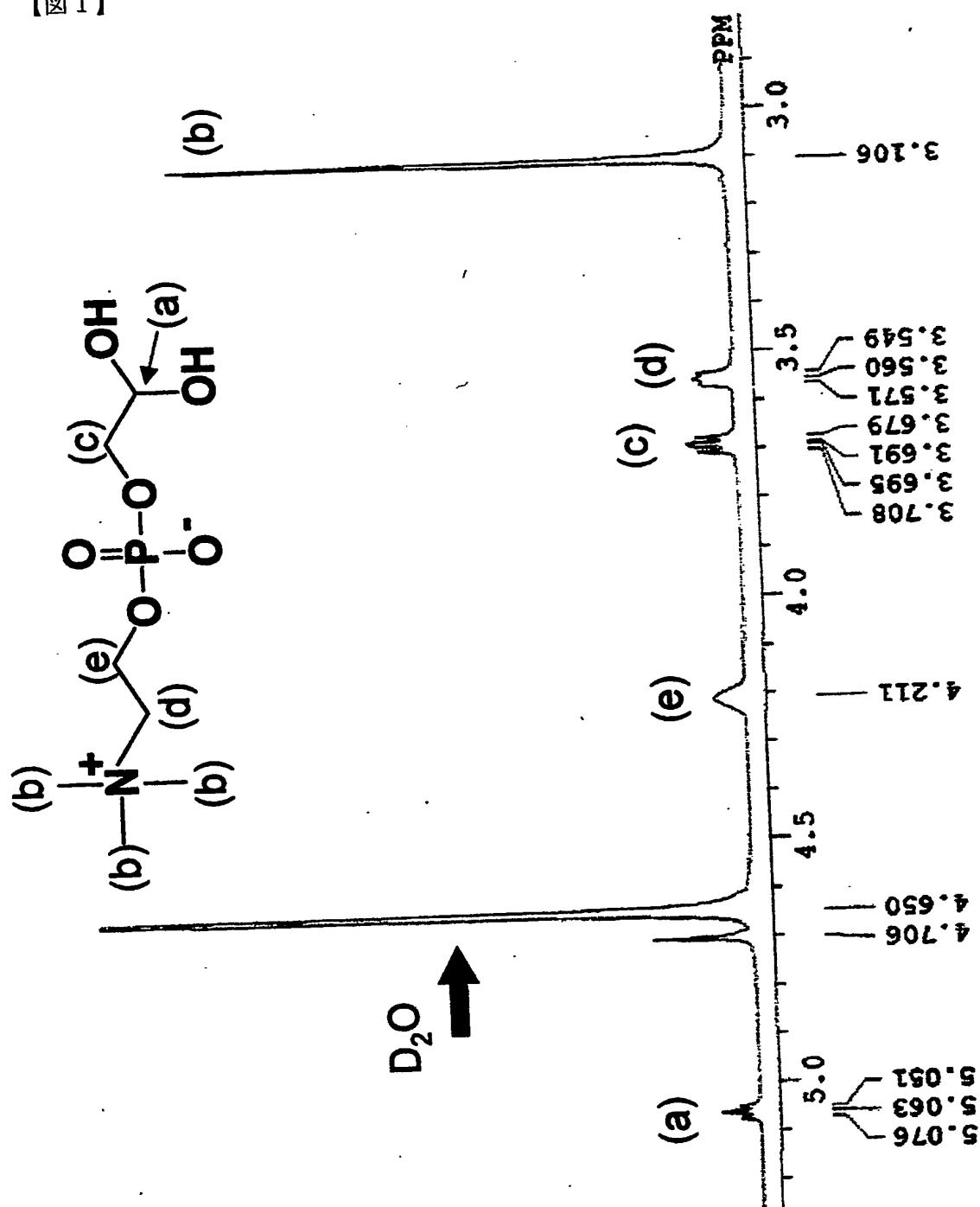
【図15】比較例2で製造した式(15)で示した化合物によって表面改質された液体クロマトグラフィー用充填剤によるクロマトグラムである。

【図16】実施例7で製造した化合物の¹H-NMRスペクトルである。

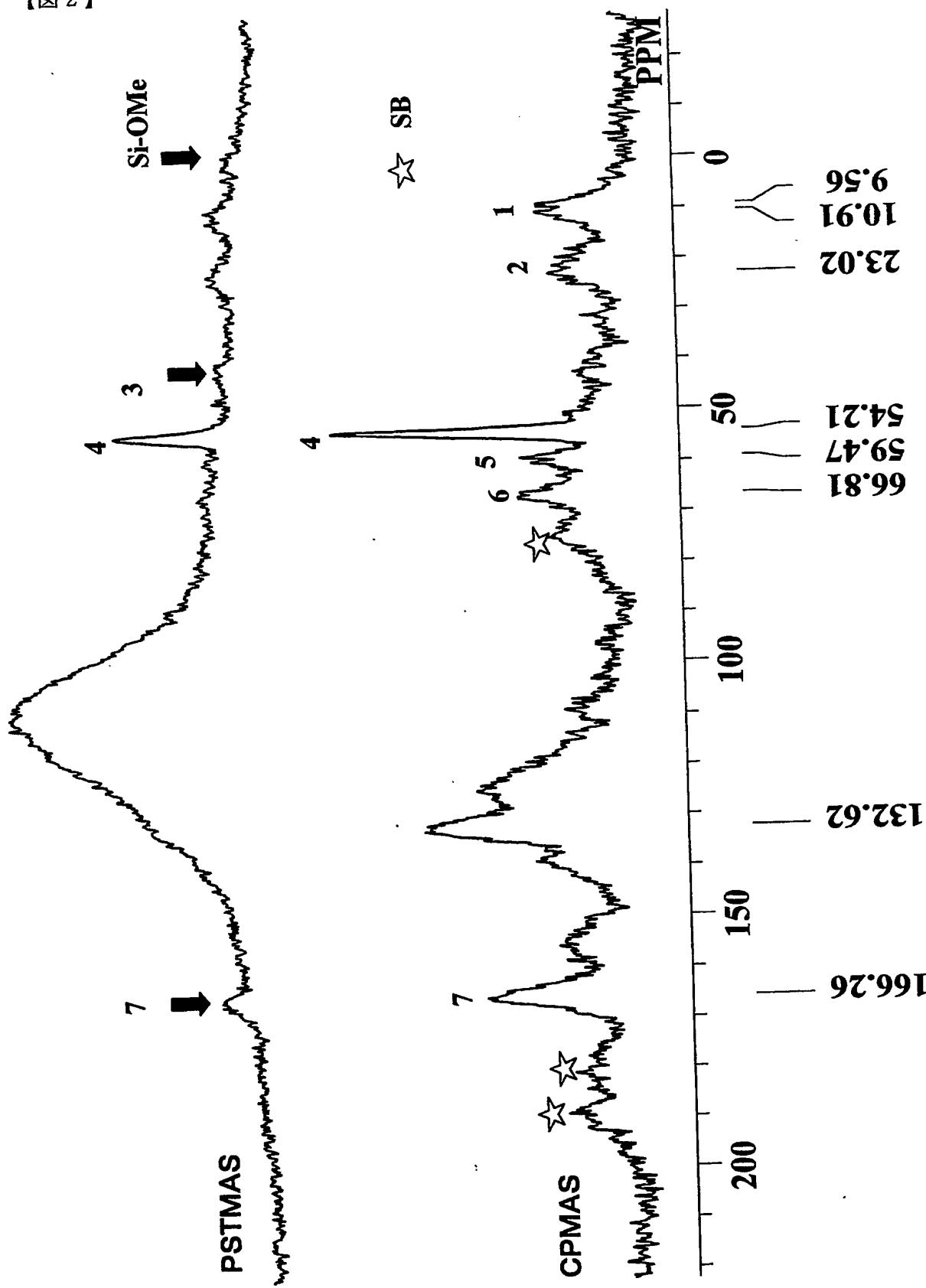
【図17】実施例7で製造した化合物のMassスペクトルである。

【図18】合成例1で製造した化合物のMassスペクトルである。

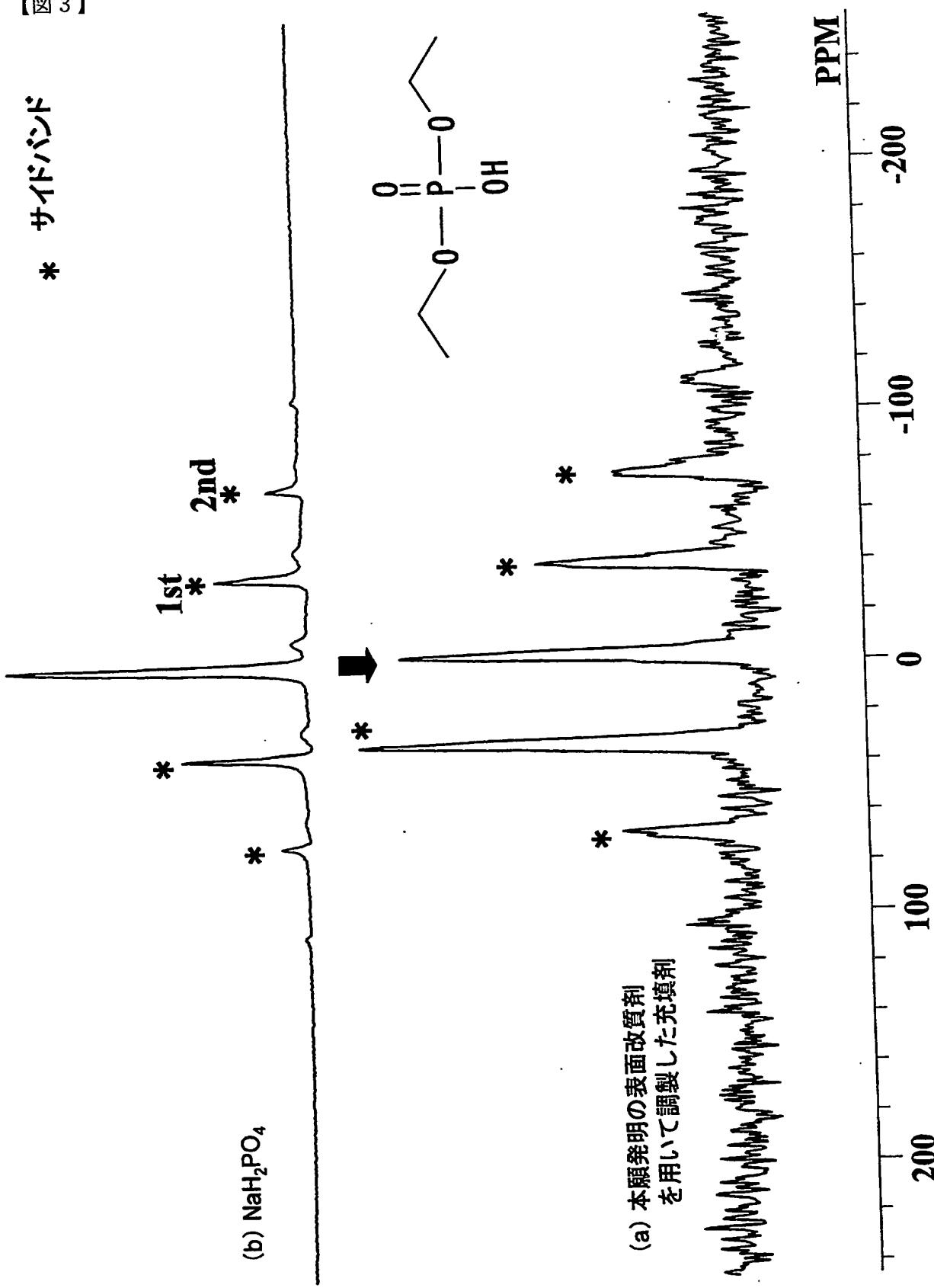
【書類名】 図面
【図1】



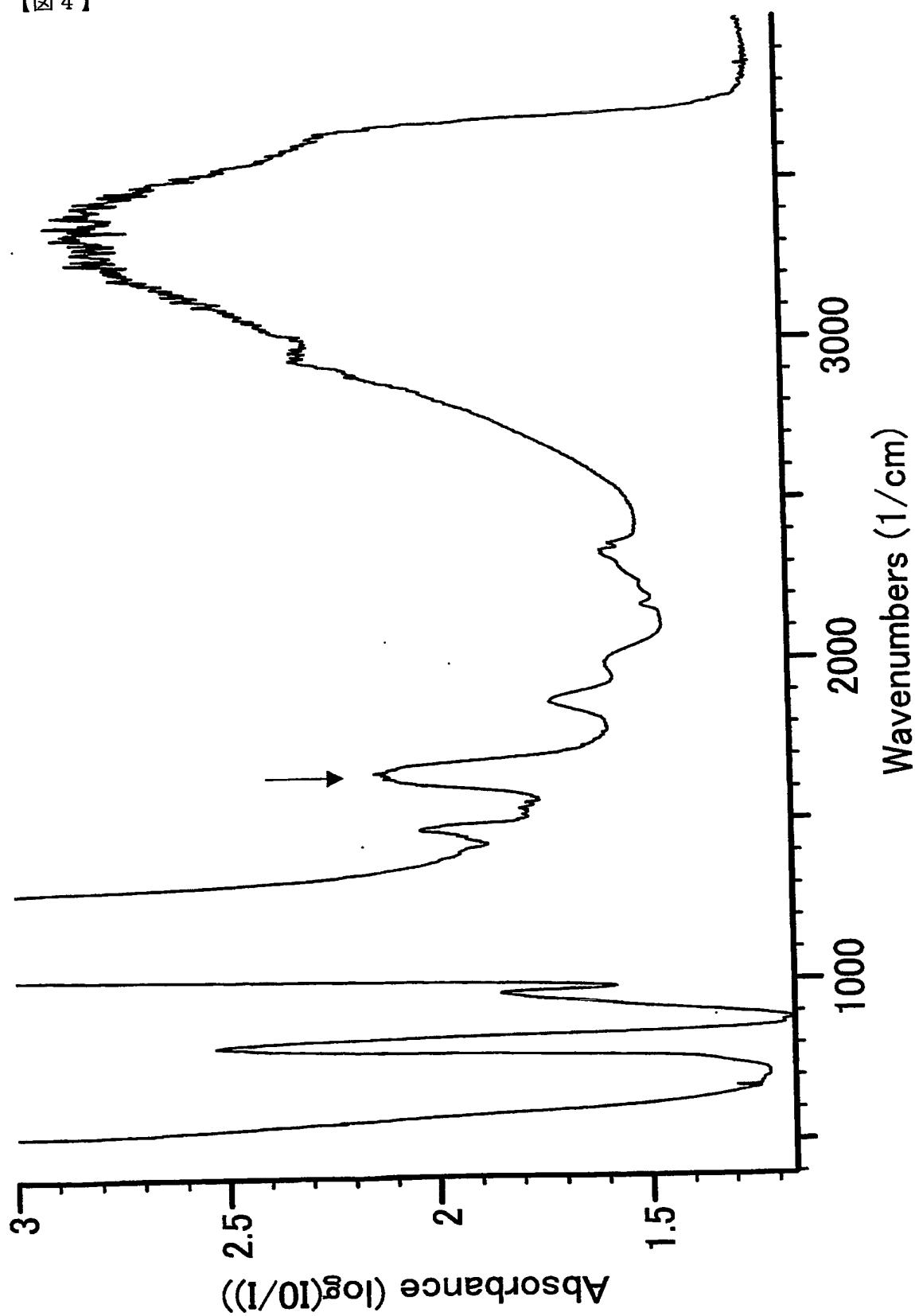
【図2】



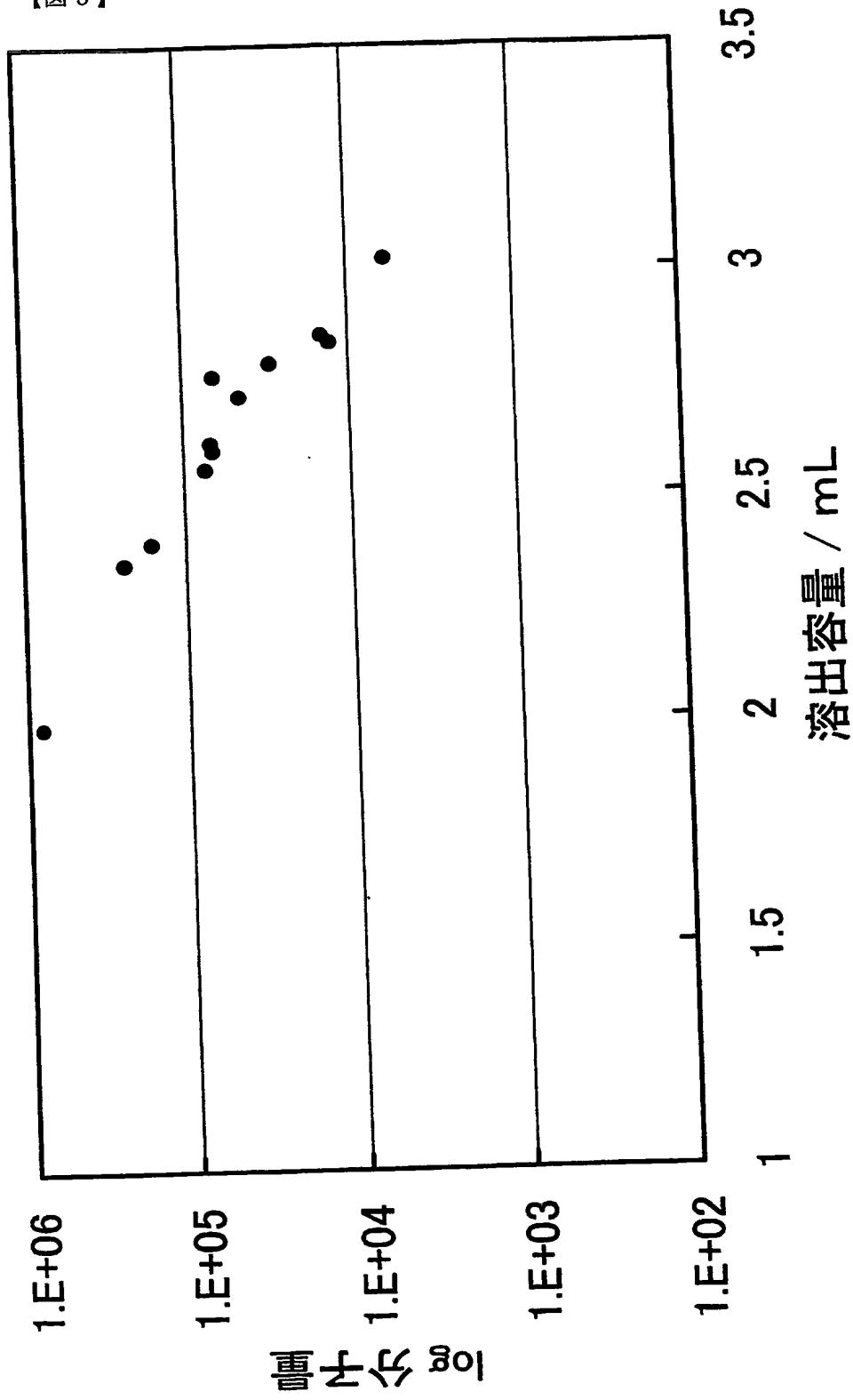
【図3】



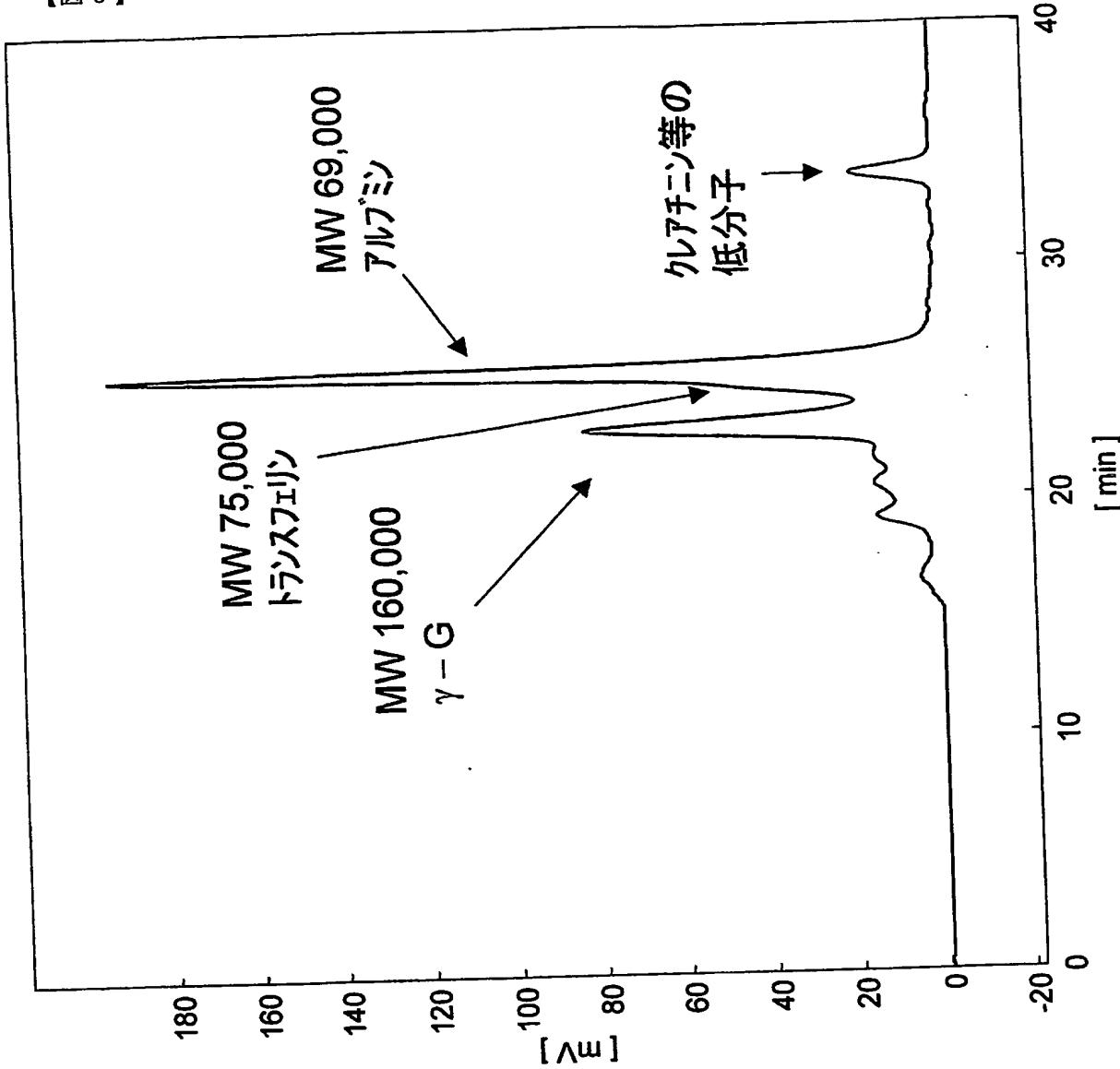
【図4】



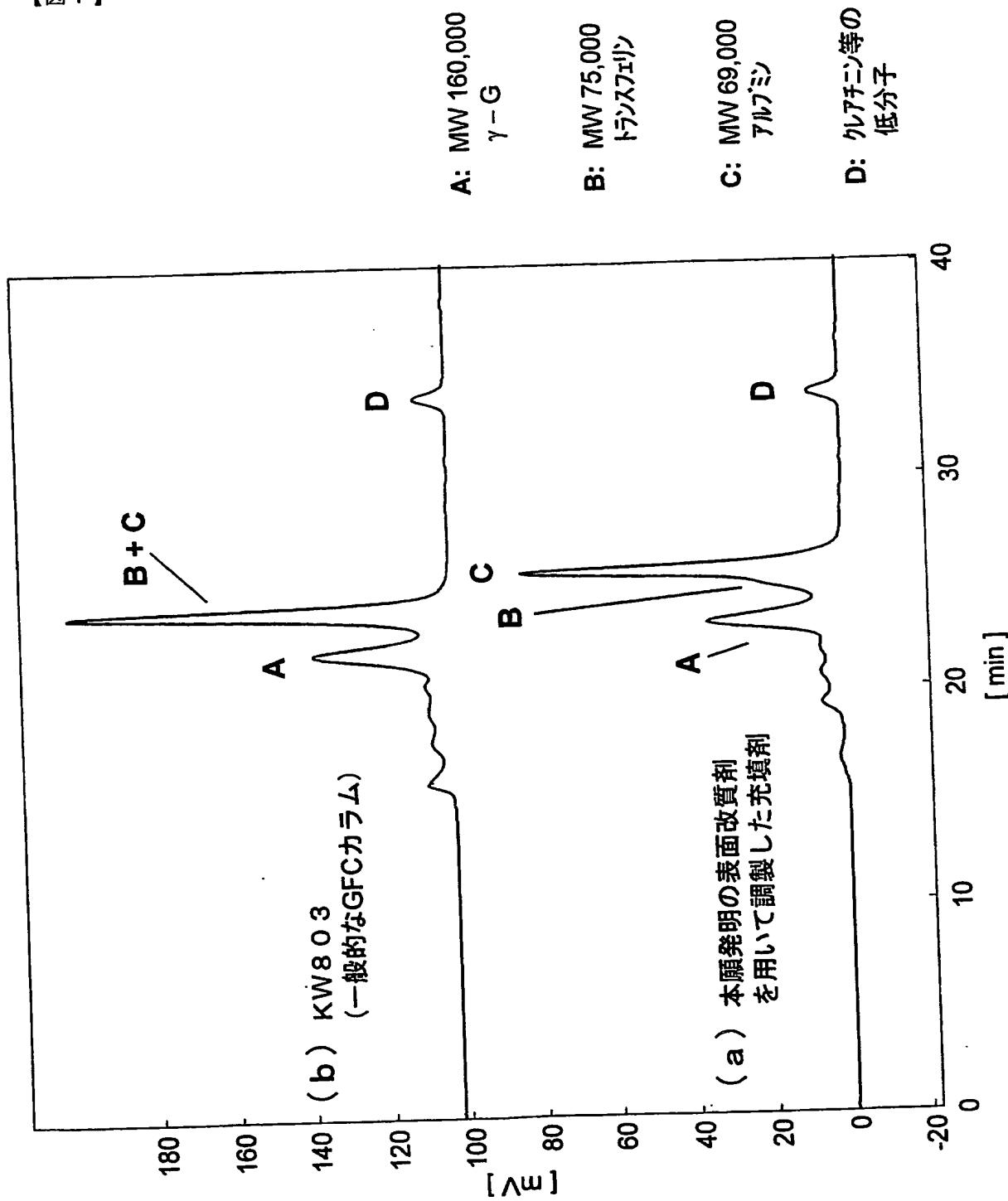
【図5】



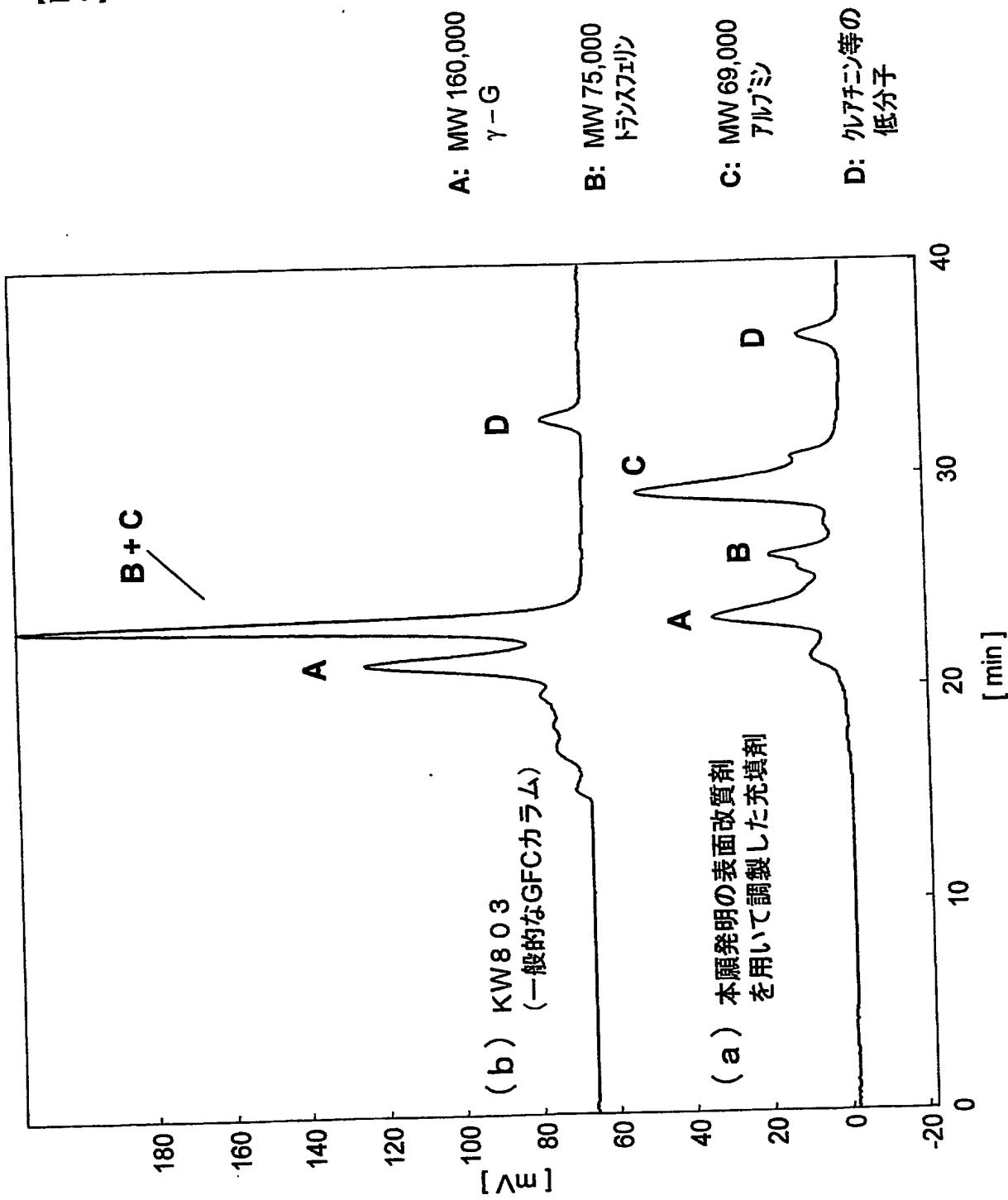
【図6】



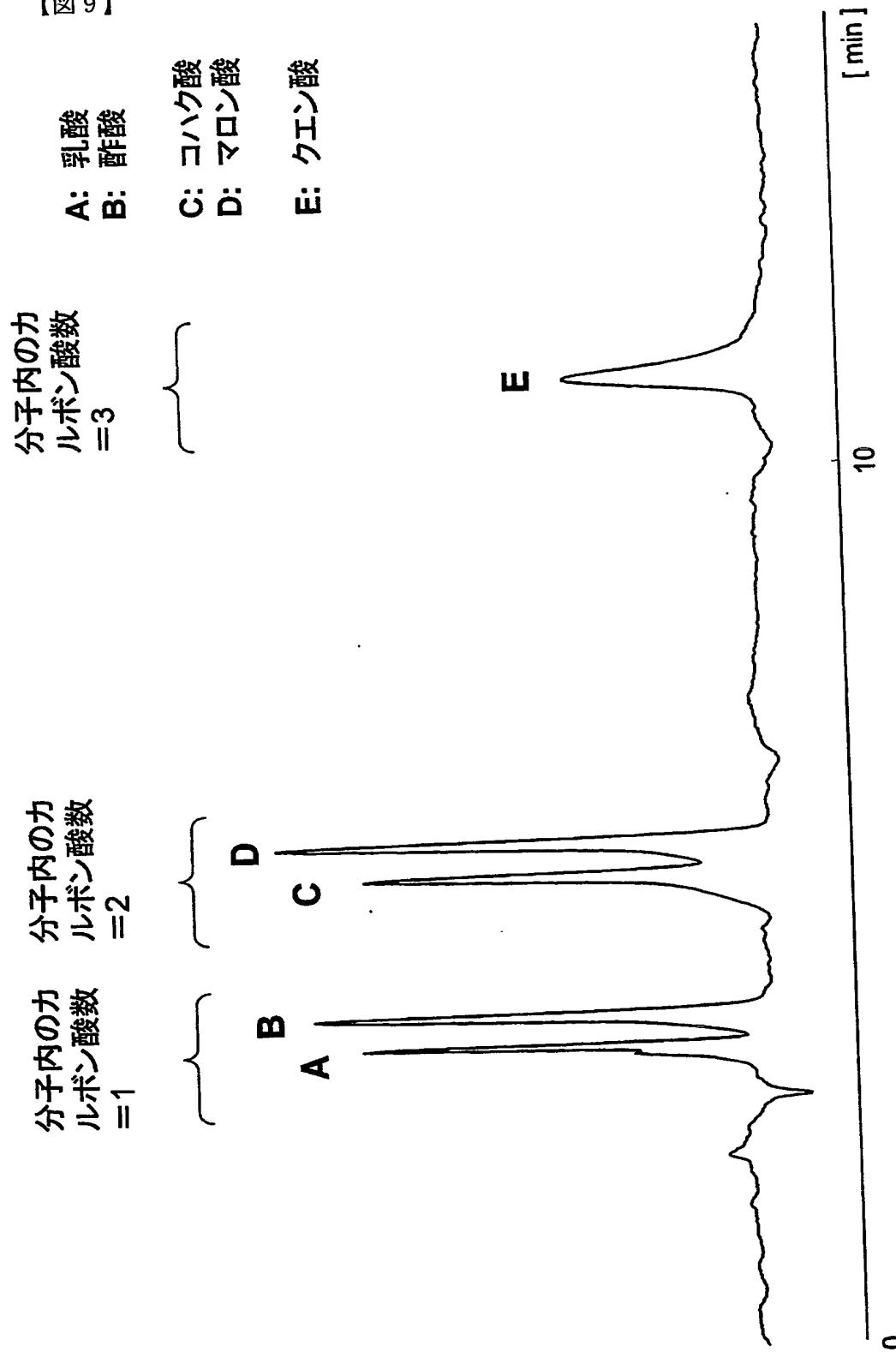
【図7】



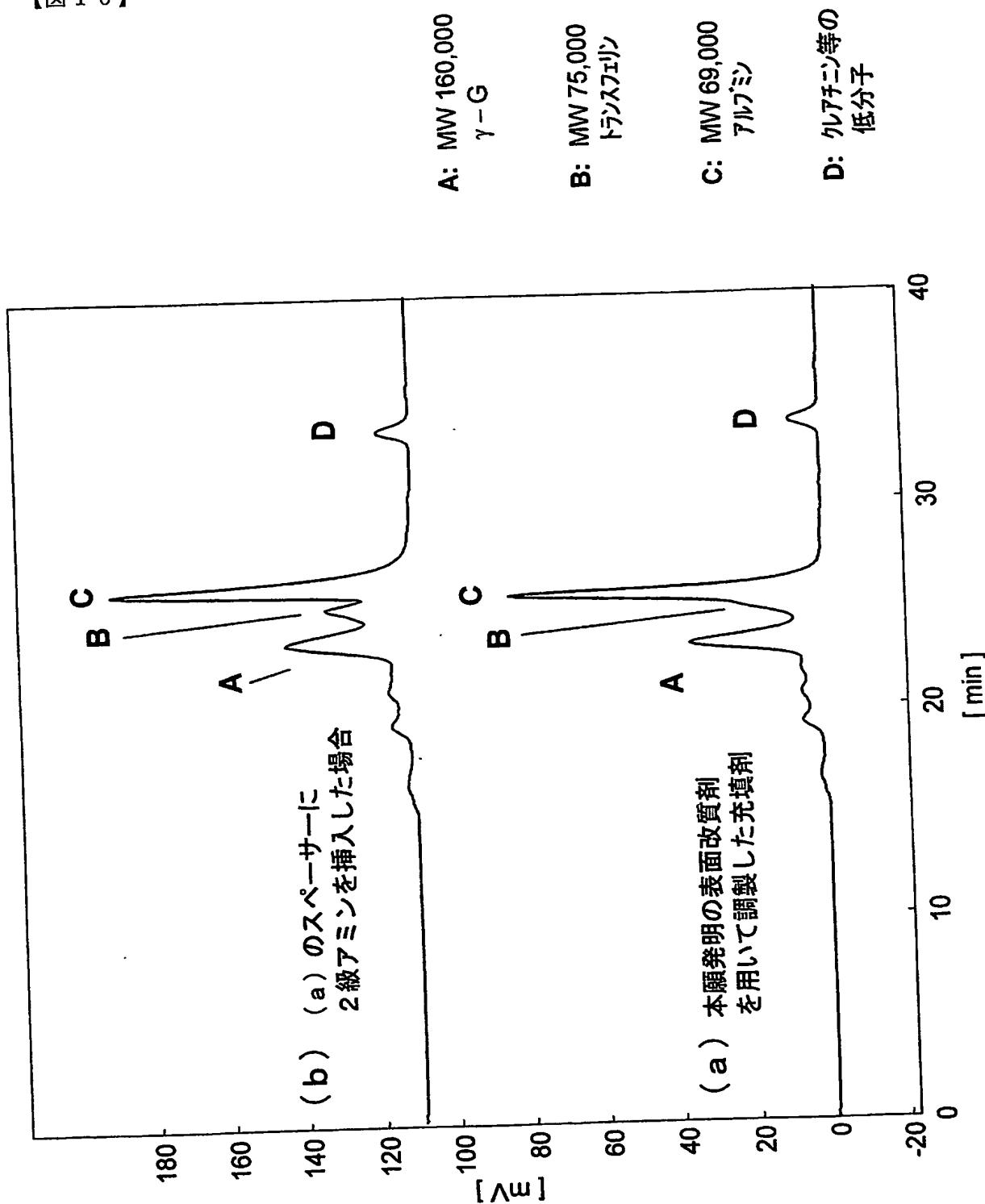
【図8】



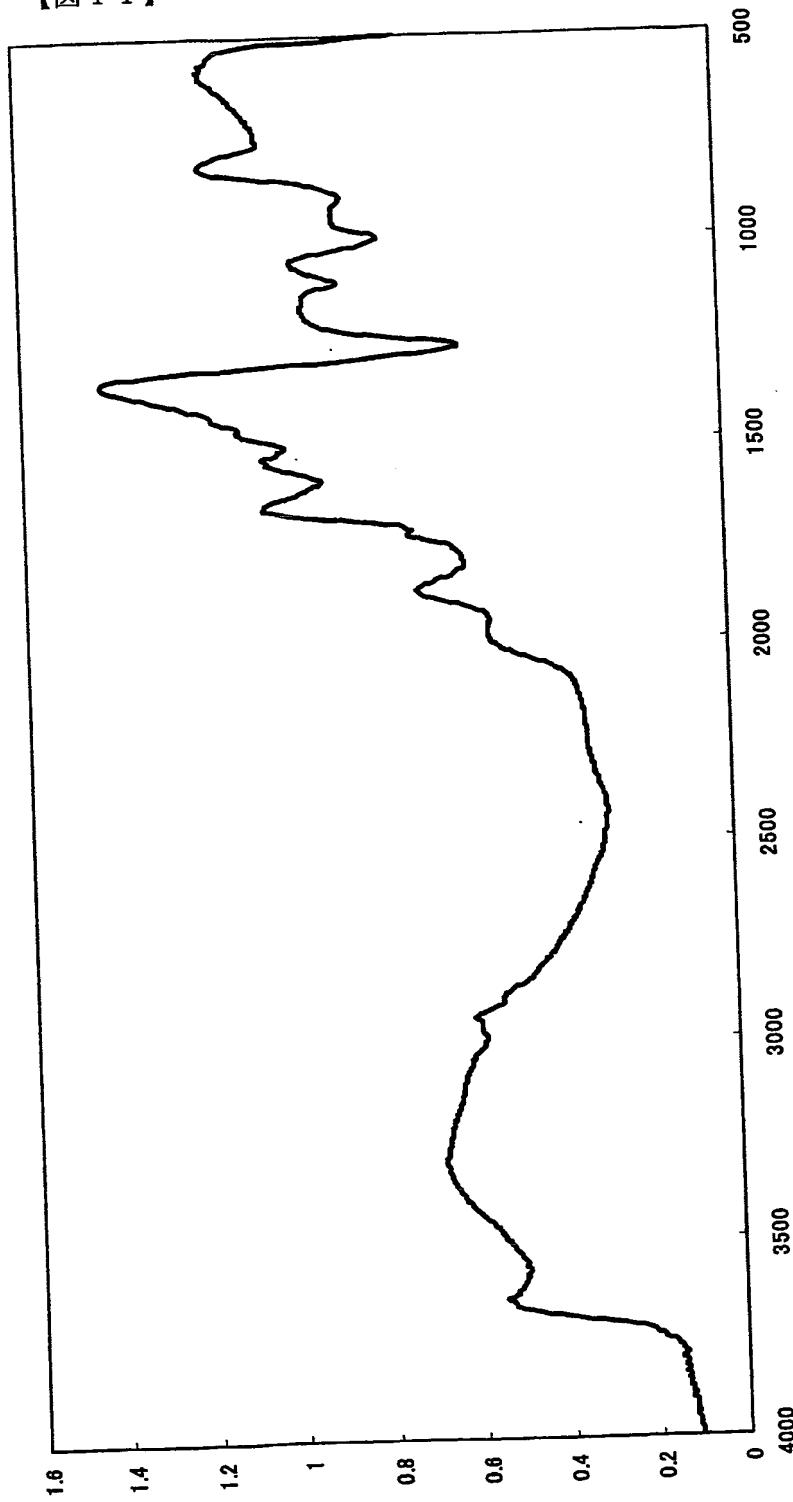
【図9】



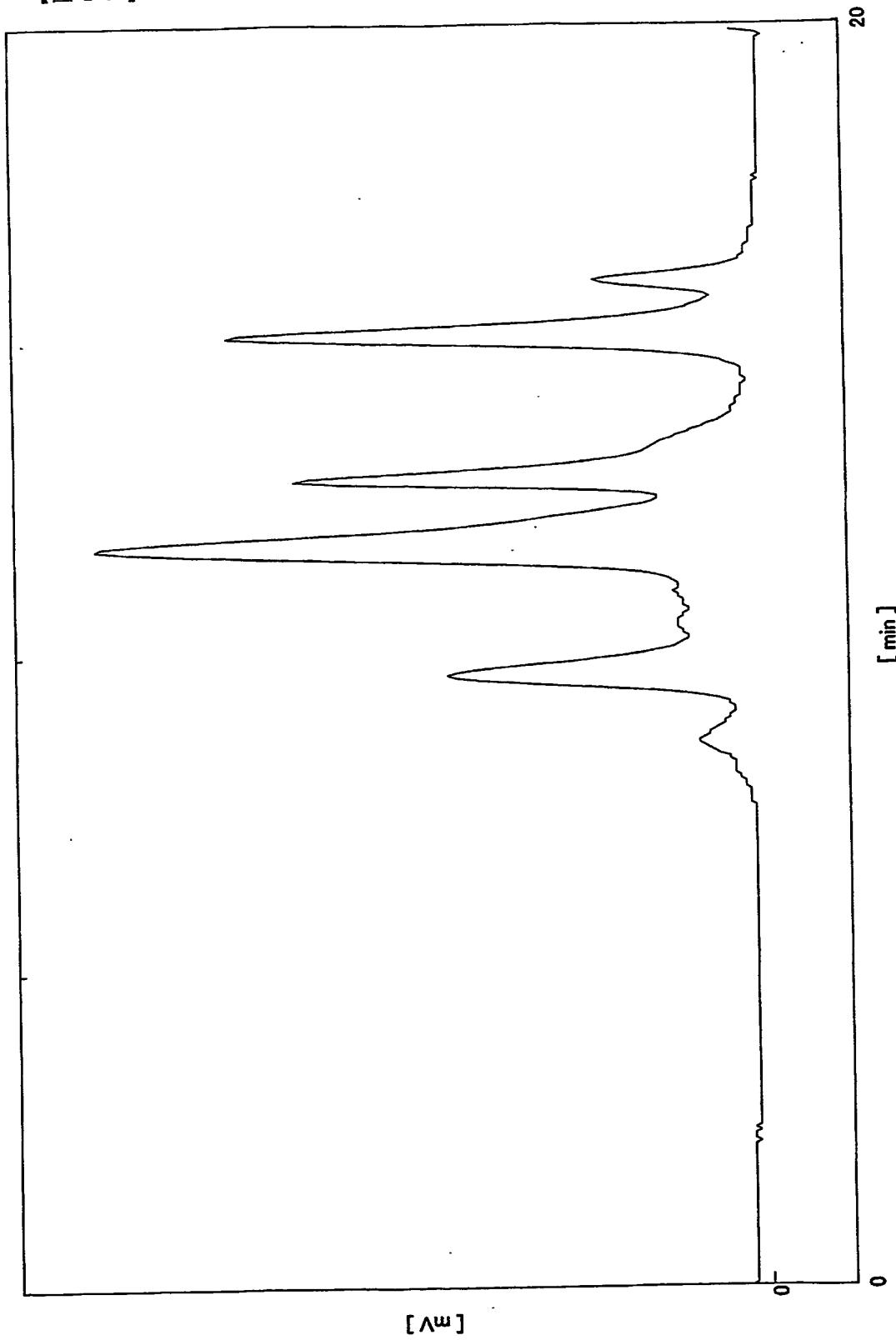
【図10】



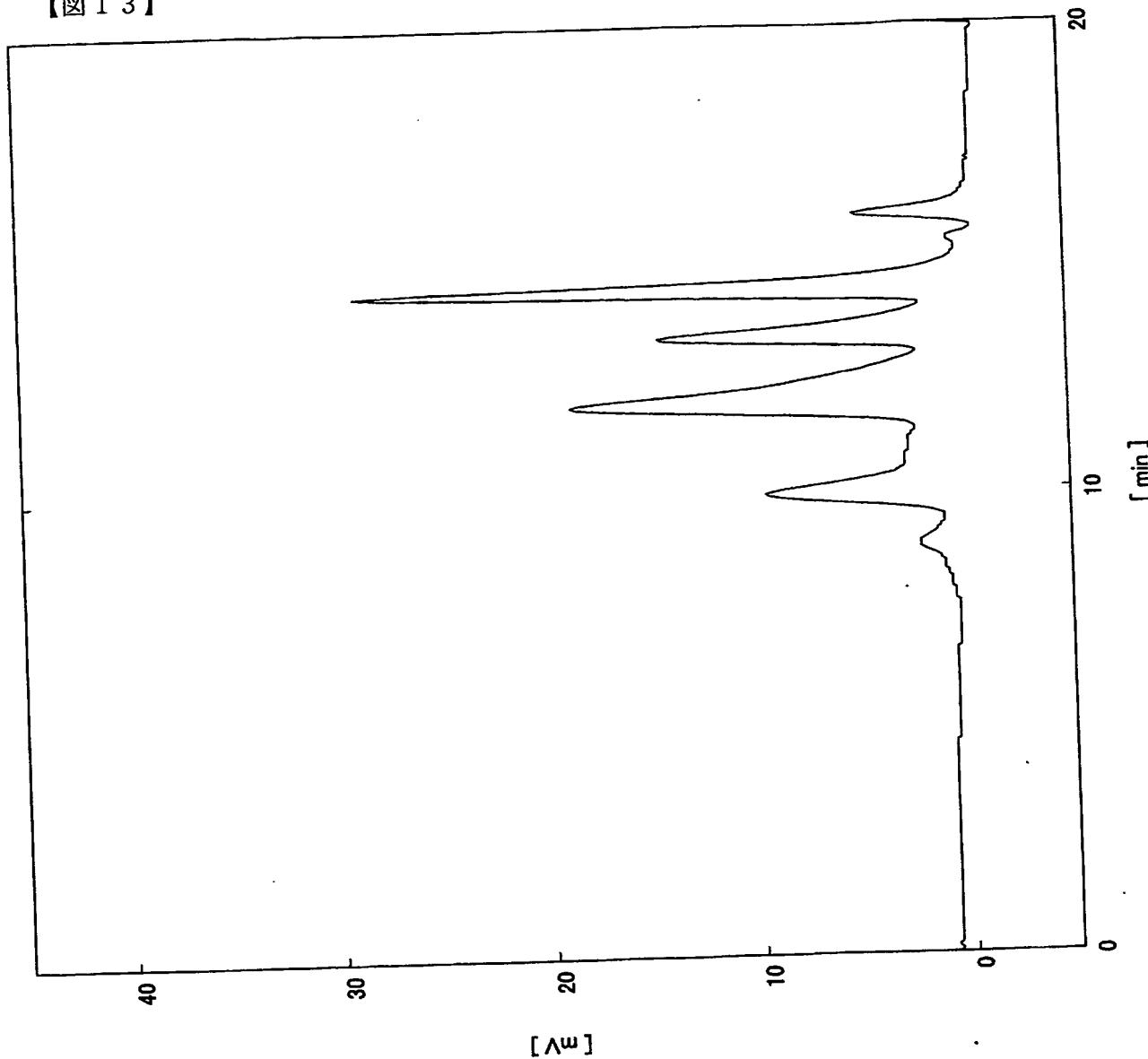
【図11】



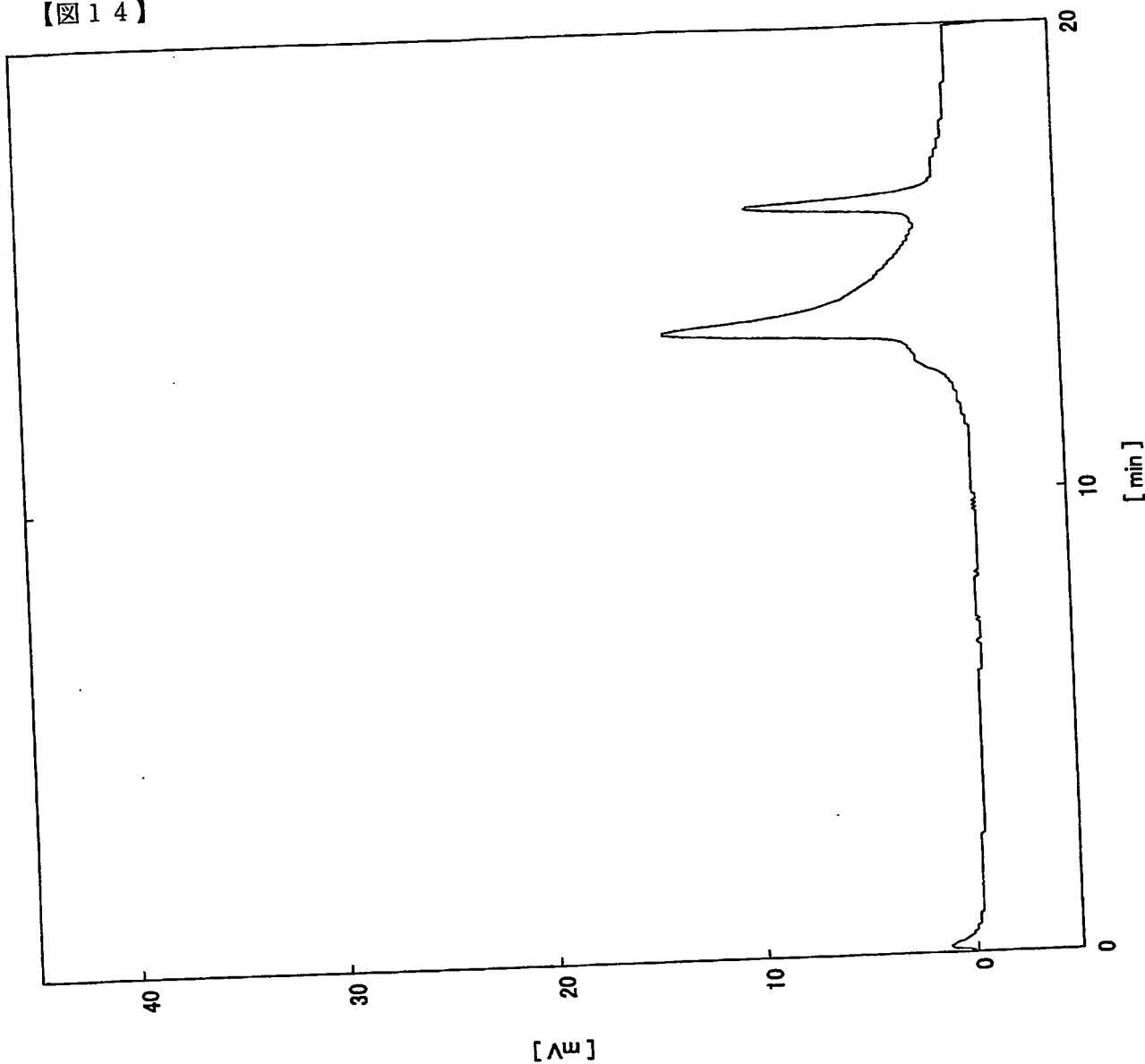
【図12】



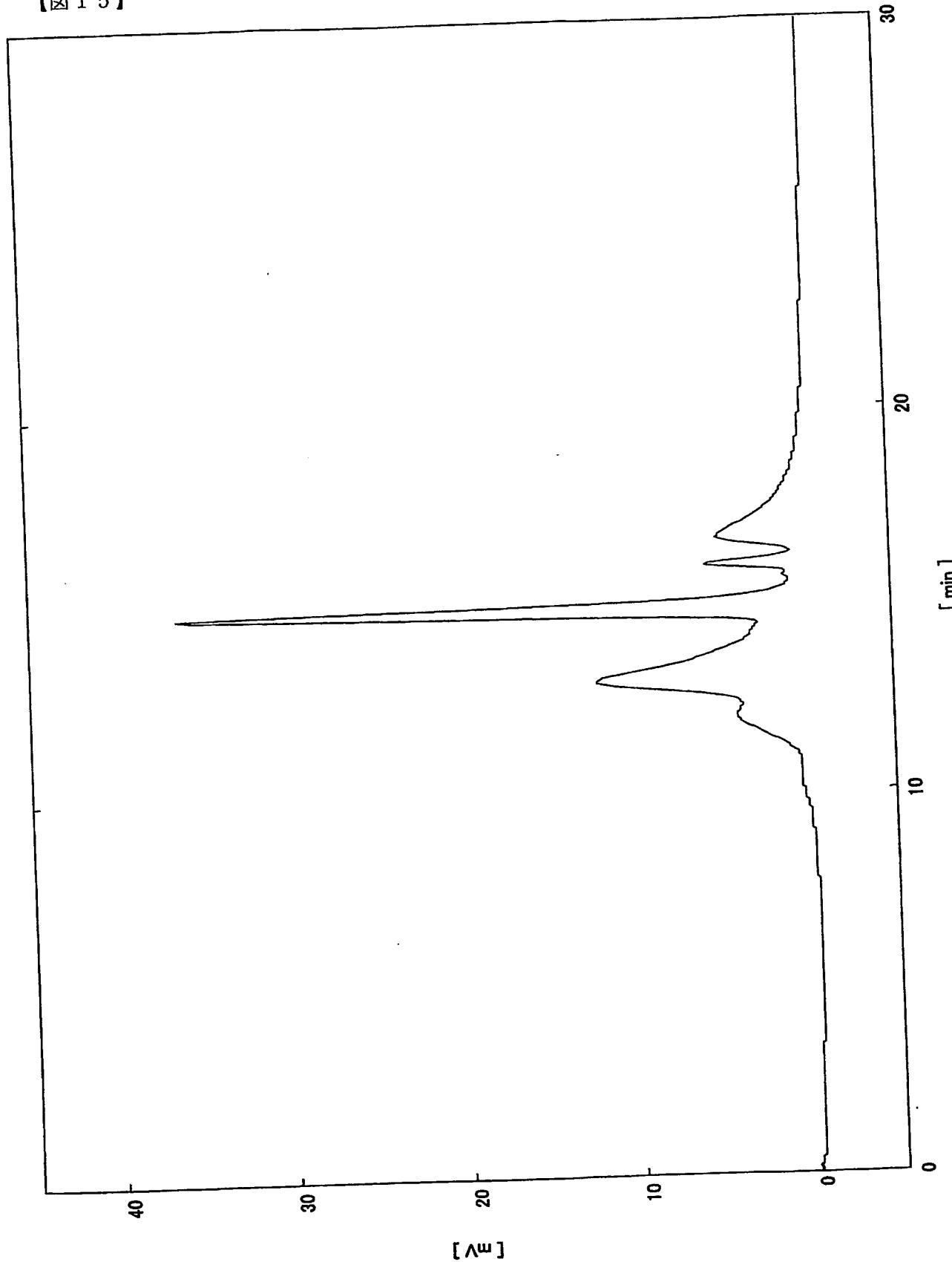
【図13】



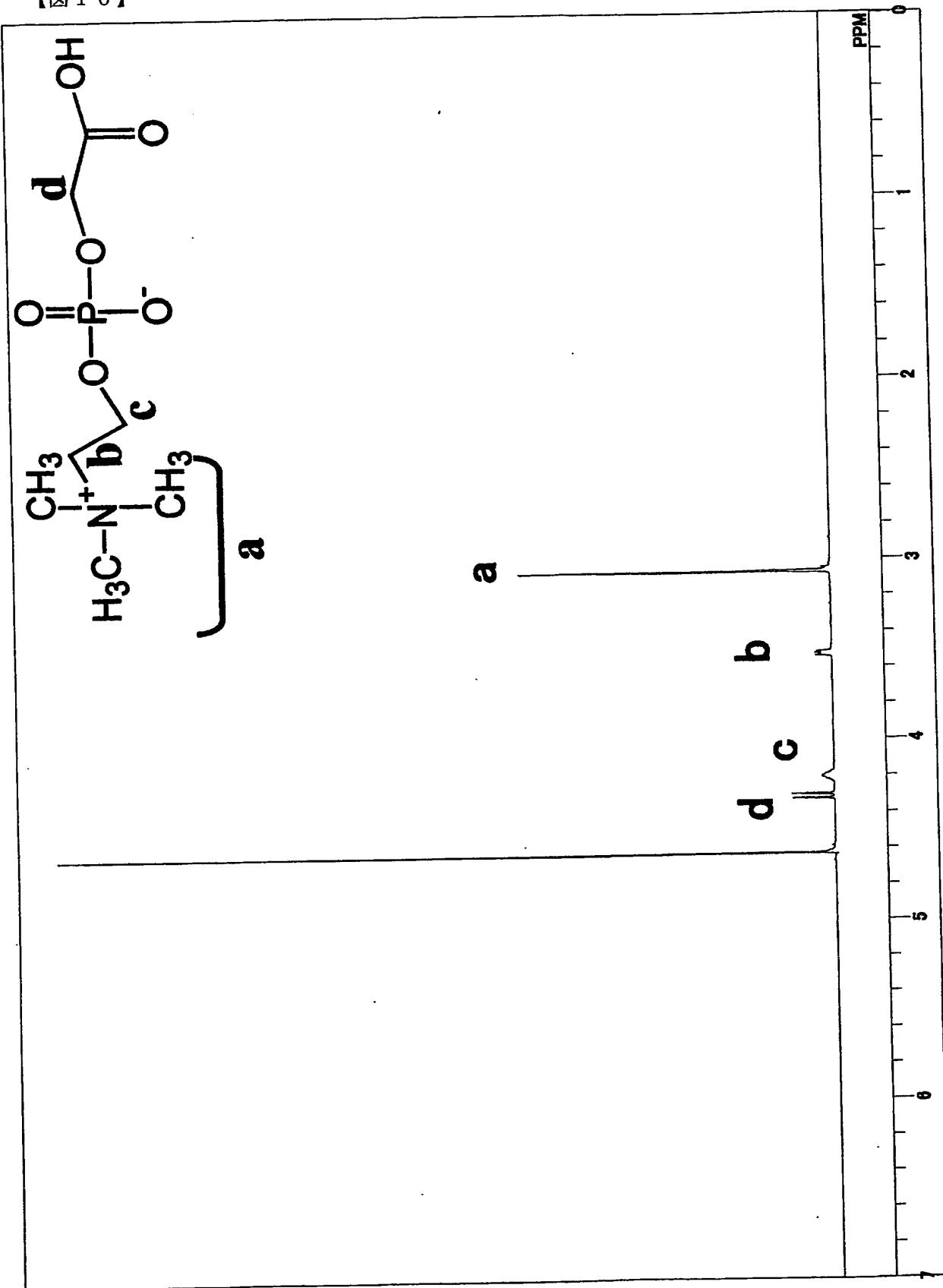
【図14】



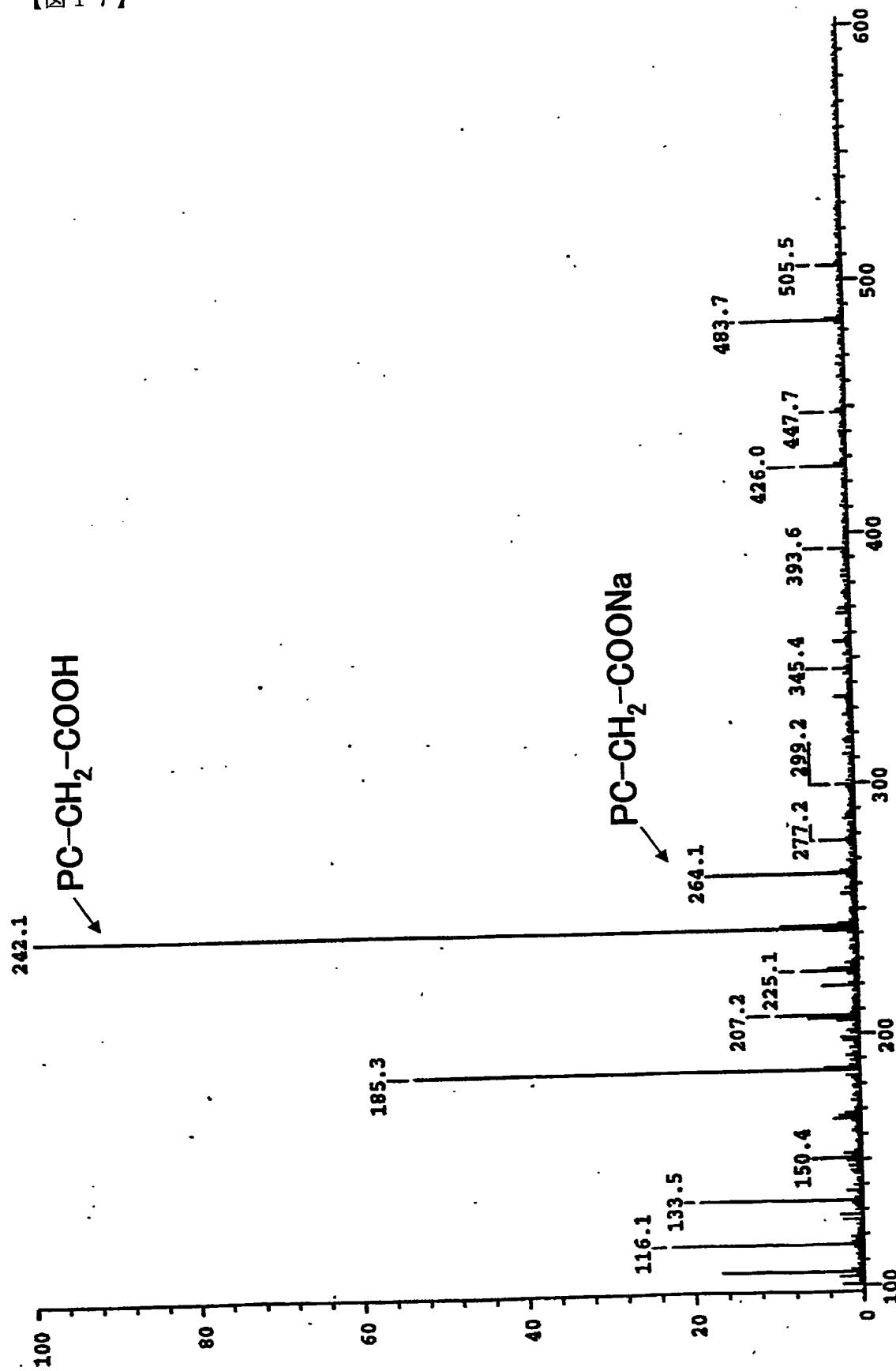
【図15】



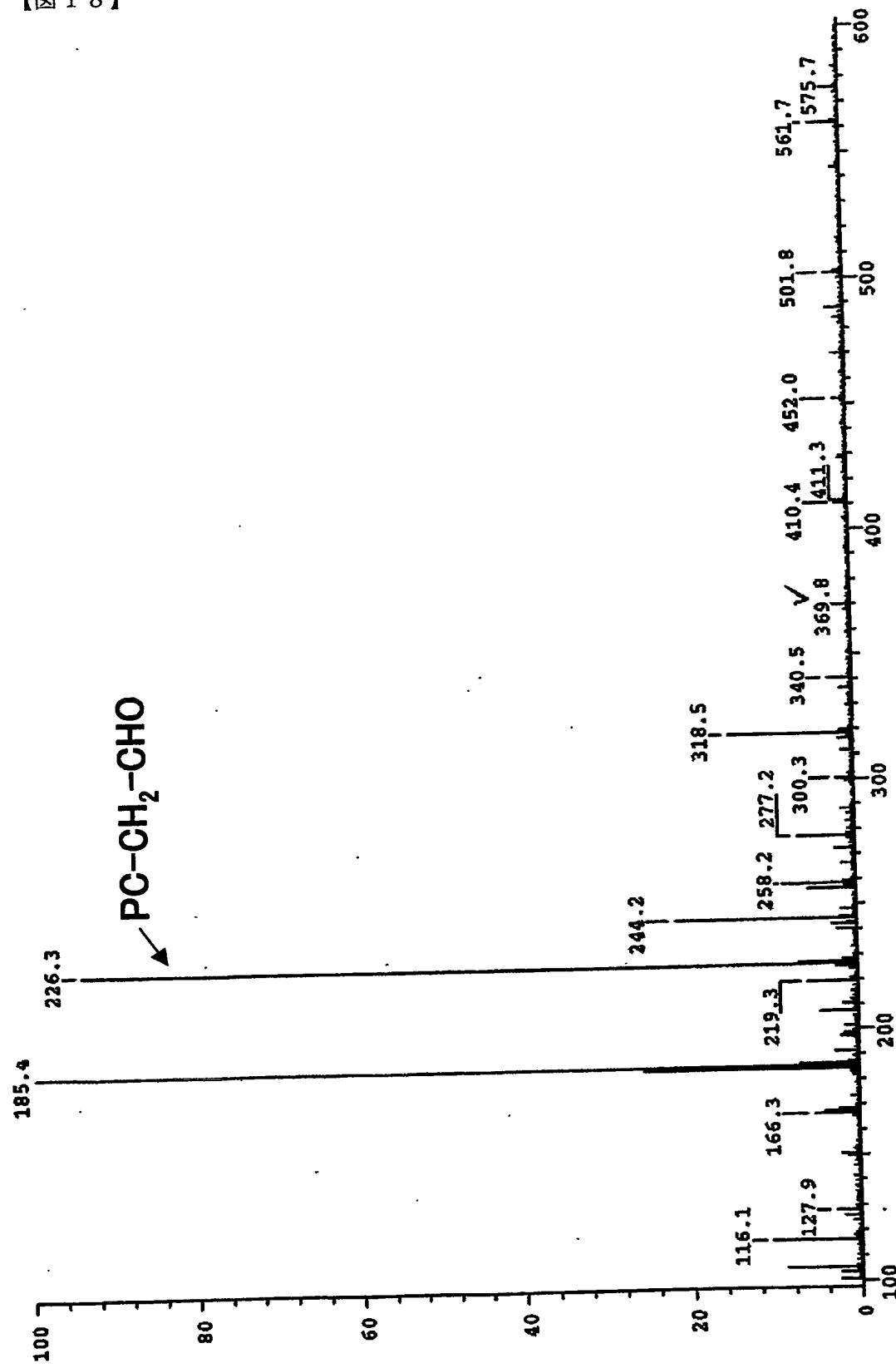
【図 16】



【図17】



【図 18】



【書類名】要約書

【要約】

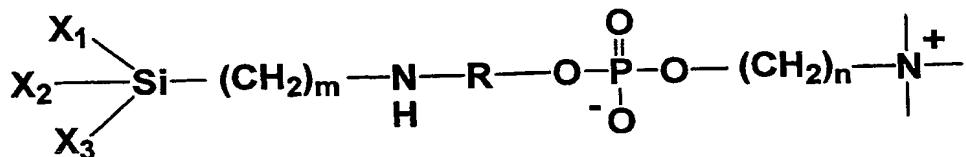
【課題】 ホスホリルコリン基を含有する新規な化合物、及び該化合物からなる表面改質剤、該表面改質剤により改質された改質粉体、該改質粉体を担体として利用したクロマトグラフイー用充填剤、該表面改質剤により改質されたフィルター、該表面改質剤により改質されたカラス器具を提供すること。

本発明の化合物からなる表面改質剤は、生体適合性、タンパク質吸着抑制、保湿性、その他に様々な有用な機能を物体に付与するものである。

【解決手段】

下記式(1)で示されるホスホリルコリン基含有化合物である。

【化1】



(1)

式中、 m は2～6、 n は1～4である。

X_1 、 X_2 、 X_3 は、それぞれ単独に、メトキシ基、エトキシ基またはハロゲンである。ただし、 X_1 、 X_2 、 X_3 のうち、2つまではメチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、ブチル基、イソブチル基のいずれでも良い。

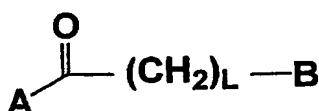
Rは下記式(2)～(4)中の構造のいずれかである(ただし、下記式(2)～(4)構造において、式(1)の化合物をA-R-Bで表す)。

[化2]

$$A - (CH_2)_L - B$$

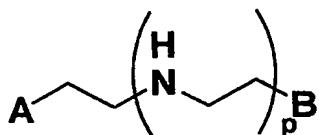
(2)

(二) [化3]



(3)

【化4】



(4)

式(2)～(4)中、Lは1～6、Pは1～3を表す。

式(2)～(4)中、上記ホスホリルコリン基含有化合物からなる表面改質剤、該表面改質剤で処理された改質粉体、該表面改質剤で処理された改質担体からなるクロマトグラフィー用充填剤、該表面改質剤で処理されたフィルター、該表面改質剤で処理されたガラス器具である。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願2004-345739
受付番号	50402041195
書類名	特許願
担当官	第六担当上席 0095
作成日	平成16年12月 3日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成16年11月30日
-------	-------------

特願 2004-345739

出願人履歴情報

識別番号 [000001959]

1. 変更年月日 1990年 8月27日

[変更理由] 新規登録

住所 東京都中央区銀座7丁目5番5号
氏名 株式会社資生堂

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP04/017835

International filing date: 01 December 2004 (01.12.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2004-345739
Filing date: 30 November 2004 (30.11.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 04 February 2005 (04.02.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.